



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2015

**Rafael Queirós
Fernandes**

**Polimorfismos da região promotora do gene *ELANE*
em doentes com doença renal terminal**



**Rafael Queirós
Fernandes**

**Polimorfismos da região promotora do gene *ELANE*
em doentes com doença renal terminal**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, especialização Clínica, realizada sob a orientação científica da Doutora Elsa Maria Ribeiro Bronze da Rocha, Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, da Doutora Maria Alice dos Santos Silva Gomes Martins, Professora Associada com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, e da Doutora Rita Maria Pinho Ferreira, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais e aos meus irmãos, os meus pilares.

o júri

presidente

Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Elísio Manuel Sousa Costa
Professor auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Professora Doutora Elsa Maria Ribeiro Bronze da Rocha
Professora auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

agradecimentos

À Professora Doutora Elsa Bronze da Rocha, minha orientadora, um muito obrigado pela boa disposição, pela disponibilidade, compreensão, persistência, acompanhamento e transmissão de conhecimentos, bem como pelas críticas e correções construtivas e pela confiança depositada no meu trabalho, que me permitiu evoluir e chegar a esta fase. Obrigado por dar significado ao cargo de orientador!

À Professora Doutora Alice Santos Silva, minha coorientadora, pelas correções cuidadas que permitiram tornar este trabalho o mais correto possível em termos científicos, e pela simpatia, disponibilidade e acompanhamento.

À Professora Doutora Rita Ferreira, minha coorientadora institucional, pela ajuda imprescindível prestada ao longo deste percurso, pela prontidão e interesse, e por, mesmo à distância, se fazer presente.

Ao Professor Doutor Elísio Sousa Costa, que aceitou ser arguente desta dissertação, pelos tempos infindáveis partilhados na análise de sequências genéticas, por mitigar o meu mau relacionamento com a estatística e por passar a ideia de que tudo é possível quando as coisas corriam menos bem.

Ao meu colega Bruno Freitas, que dispensou várias vezes parte do seu tempo para me ajudar no laboratório, pelo companheirismo, interesse e preocupação demonstradas ao longo destes meses. Espero de alguma forma ter contribuído para o seu percurso académico!

Aos investigadores, professores e funcionários do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, que me acompanharam, acolheram e fizeram sentir em casa, um muito obrigado pela boa disposição, pelos momentos partilhados e, em particular, um obrigado à Doutora Susana e à Doutora Sandra, pela preocupação, ajuda e transmissão de conhecimentos, que contribuíram para levar a bom porto este trabalho. De igual forma, obrigado às minhas colegas Carina, Lia e Filipa, pela partilha e companheirismo, e por tornarem os almoços à hora do lanche um momento agradável e não de desespero!

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram e que dão sentido à vida, obrigado pelo apoio, pela presença nos bons e maus momentos, pelos sorrisos e gargalhadas, pela alegria partilhada nas conquistas e pelos “vai correr tudo bem” quando as frustrações me vencem!

À minha melhor amiga Vânia, a minha metade, voz da consciência, companheira de “viagem”, que me conhece melhor do que eu próprio às vezes...obrigado por estar sempre presente e por querer assistir na primeira fila, com um grande sorriso de orgulho, às minhas vitórias, e por ser a primeira a levantar-me do chão quando os obstáculos são maiores do que eu!

Por último, mas de maneira alguma menos importante, aos meus pais e aos meus irmãos, que são o meu exemplo diário e a quem devo aquilo que sou hoje! Obrigado pela paciência, pelo colo, pelo carinho e pelas palavras duras e assertivas que me fazem crescer. Obrigado pelo abraço protetor apertado e pelas asas, que me permitem ser livre e arriscar, sabendo que estarão sempre lá para mim! Espero deixá-los orgulhosos...

Não pretendo de todo desvalorizar ninguém ao fazer generalizações nestes agradecimentos; infelizmente, o espaço disponível não me permite nomear todas as pessoas importantes para mim, mas quero salientar que todos estavam individualmente presentes na minha mente enquanto redigi estas palavras! Obrigado a todos e por tudo!

palavras-chave

Inflamação, *stress* oxidativo, doença renal crónica, hemodiálise, elastase, gene *ELANE*, polimorfismos.

resumo

A doença renal crónica (DRC) é um problema de saúde pública com uma prevalência mundial crescente. Os doentes terminais apresentam uma taxa de mortalidade que excede a da população em geral. A inflamação é uma característica clínica comum dos doentes em terapia de hemodiálise, não havendo, no entanto, um conhecimento claro sobre os mecanismos bioquímicos subjacentes. Foi demonstrado que o procedimento hemodialítico promove a ativação de neutrófilos, com libertação de elastase, podendo desempenhar um papel importante na resposta inflamatória, e no desenvolvimento de *stress* oxidativo, dois fatores que, em conjunto, podem agravar a anemia e o risco de doenças cardiovasculares, que são a principal causa de mortalidade desta população. A elastase neutrofílica, uma protease capaz de degradar várias proteínas da matriz extracelular, é codificada pelo gene *ELANE*, que foi associado ao desenvolvimento de várias patologias e ao aumento do risco de desenvolvimento de cancro do pulmão. A presença de mutações e polimorfismos neste gene parecem determinar modificações ao nível da expressão da elastase, promovendo distúrbios proteolíticos.

Este trabalho teve como objetivos identificar e avaliar o impacto dos polimorfismos da região promotora do gene *ELANE* nos níveis circulantes de elastase, a sua associação com alterações hematológicas, inflamatórias, nutricionais e de adequação da diálise, e com o risco de mortalidade na DRC. Para isso, realizou-se um estudo transversal com 123 doentes renais terminais portugueses em hemodiálise. Estudaram-se os polimorfismos no promotor do gene *ELANE*, por PCR-sequenciação direta. Os níveis plasmáticos de elastase foram determinados por ELISA. Avaliou-se a correlação de cada polimorfismo com vários parâmetros clínicos, marcadores hematológicos e inflamatórios, de metabolismo do ferro, do estado nutricional e de adequação da diálise, recolhidos dos registos dos doentes.

Dos cinco polimorfismos já descritos na literatura, identificaram-se três neste grupo de doentes: c.-903T>G, c.-741G>A, e a presença de uma sequência extra de 52 pb. Além disso, identificaram-se dois novos polimorfismos: c.-801G>A, e a presença de um bloco extra, composto pela quarta e pela quinta repetição que compõem a região promotora do gene. Estes polimorfismos não parecem influenciar significativamente os níveis circulantes de elastase, nem o processo inflamatório dos doentes, não apresentando influência sobre o prognóstico da doença.

keywords

Inflammation, oxidative stress, end-stage chronic kidney disease, hemodialysis, elastase, *ELANE* gene, polymorphisms.

abstract

End-stage renal disease (ESRD) is a growing public health problem with an increasing worldwide prevalence. ESRD patients present a high mortality rate that far exceeds the mortality rate for the non-ESRD population. Inflammation is a common feature of the patients under hemodialysis; however, the mechanisms/factors triggering the inflammatory process are still poorly clarified. It has been recently demonstrated that hemodialysis procedure induces neutrophil activation and elastase release, which might have an important role in the inflammatory process and in the development of oxidative stress, two factors that can increase the anemia and the risk of cardiovascular diseases, which are the leading cause of mortality in this population. Neutrophil elastase, a protease capable of degrading several extracellular matrix proteins, is encoded by *ELANE* gene that has been shown to be related with the development of several pathologies and with the higher risk of developing lung cancer. The presence of mutations and polymorphisms in this gene appear to influence the level of elastase expression, promoting proteolytic imbalances.

This study aimed to identify and assess the impact of polymorphisms of the promoter region of the *ELANE* gene in the circulating levels of elastase, their association with hematological, inflammatory and nutritional alterations, dialysis adequacy and with mortality in DRC. To accomplish these objectives, we performed a cross-sectional study with 123 ESRD patients on regular hemodialysis. The promoter region of the *ELANE* gene was screened for all patients using PCR-direct sequencing and elastase quantification was performed by ELISA. We evaluated the correlation of each polymorphism with various clinical and hematological data, inflammatory and iron metabolism markers, nutritional status and dialysis adequacy, collected from patient records.

Of the five polymorphisms already described in the literature, we identified three in this group of patients: c.-903T>G, C-741G>A and the presence of an extra sequence of 52 bp. In addition, we identified two new polymorphisms: c.-801G>A and the presence of an extra block composed of the fourth and the fifth repeat that make up the promoter region of the gene. These polymorphisms do not appear to significantly influence circulating levels of elastase or the inflammation state of the patients, not influencing the prognosis of the disease.

ÍNDICE

ÍNDICE	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XI
ABREVIATURAS	XII
I. Introdução.....	1
1. Anatomia e função renal.....	3
1.1. Avaliação da função renal	4
2. Doença renal crónica	5
2.1. Diagnóstico e classificação da doença renal crónica	6
2.2. Terapêutica da doença renal crónica	8
2.3. A hemodiálise no tratamento da doença renal crónica terminal	9
2.3.1. Procedimento hemodialítico	10
2.3.2. Acesso vascular para hemodiálise	12
3. Complicações associadas à doença renal crónica terminal	12
3.1. Inflamação e ativação de leucócitos.....	13
3.1.1. Inflamação, doenças cardiovasculares e anemia associada à doença renal crónica.....	17
3.1.2. Alterações no metabolismo do ferro	19
3.2. Stress oxidativo	22
3.2.1. Lesões eritrocitárias	25
4. Atividade da elastase e polimorfismos no gene <i>ELANE</i>	28
II. Objetivos	31
III. Materiais e métodos	35
1. População em estudo.....	38
2. Recolha de amostras de sangue e avaliação laboratorial	38
3. Identificação dos polimorfismos da região promotora do gene <i>ELANE</i>	39
3.1. Extração de DNA genómico a partir da <i>buffy coat</i>	39
3.2. Amplificação da região promotora do gene <i>ELANE</i>	40

3.3. Sequenciação dos produtos de PCR	41
3.4. Análise das sequenciações	41
4. Quantificação da elastase plasmática	42
5. Análise estatística	42
IV. Resultados.....	45
1. Identificação dos polimorfismos da região promotora do gene <i>ELANE</i>	47
1.1. Prevalências e frequências alélicas dos polimorfismos identificados.....	51
2. Relação dos polimorfismos c.-903T>G e c.-741G>A com os níveis plasmáticos de elastase e com outros parâmetros em análise.....	52
V. Discussão.....	57
VI. Conclusão.....	65
VII. Bibliografia	69
Anexos	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia do rim (A) e do nefrônio (B).....	3
Figura 2 - Circuito de hemodiálise.....	11
Figura 3 - Produção de proteínas e substâncias pró-inflamatórias pela ativação do fator de transcrição NF-κB.....	14
Figura 4 - O papel da inflamação na resistência à rhEPO.....	19
Figura 5 - Aumento da expressão do gene da hepcidina por ação da IL-6.....	21
Figura 6 - Formação de ROS.....	22
Figura 7 - Representação esquemática da ativação do Nrf2 e do NF-κB pelas ROS.....	24
Figura 8 - Representação esquemática da membrana dos eritrócitos.....	26
Figura 9 - Estrutura do gene <i>ELANE</i> e polimorfismos identificados na região promotora.....	29
Figura 10 - Fluxograma do trabalho experimental.....	37
Figura 11 - Eletroforese dos produtos de PCR obtidos, correspondentes à região promotora do gene <i>ELANE</i> , em gel de agarose 2%.....	47
Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de doentes apresentando duas bandas, e comparação com o produto de PCR de um doente com uma banda.....	48
Figura 13 - Eletroferogramas representativos dos SNPs identificados nos doentes renais crônicos em estudo.....	49
Figura 14 - Eletroforese dos produtos de PCR dos doentes que apresentavam duas bandas correspondentes a duplicações na região promotora do gene <i>ELANE</i>	50
Figura 15 - Sequência da região promotora do gene <i>ELANE</i> e a sequência extra de 52 pb.....	50
Figura 16 - Sequência da região promotora do gene <i>ELANE</i> e a sequência do bloco extra.....	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da DRC, com base na TFG e no grau de albuminúria, e prognóstico da doença.	6
Tabela 2 - Critérios para definição de DRC.	7
Tabela 3 - Condições utilizadas na PCR convencional para amplificação da região promotora do gene <i>ELANE</i>	41
Tabela 4 - Prevalência e frequências alélicas para cada polimorfismo identificado na população doente renal crônica em estudo.	52
Tabela 5 - Dados clínicos e sociodemográficos, eficiência de diálise, valores hematológicos e de marcadores de metabolismo do ferro, inflamatórios e nutricionais, para o genótipo do polimorfismo c.-903T>G.	54
Tabela 6 - Dados clínicos e sociodemográficos, eficiência de diálise, valores hematológicos e de marcadores de metabolismo do ferro, inflamatórios e nutricionais, para o genótipo do polimorfismo c.-741G>A.	55

ABREVIATURAS

α1-AP	α 1-antitripsina
Abs	Absorvência
ADMA	Dimetilarginina assimétrica (<i>asymmetric dimethylarginine</i>)
ApoA-1	Apolipoproteína A-1
ARE	Elementos de resposta antioxidante (<i>antioxidant responsive elements</i>)
BMI	Índice de massa corporal (<i>body mass index</i>)
BTP	Proteína residual- β (<i>β-trace protein</i>)
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CFU-E	Unidades formadores de colónias eritroides (<i>colony-forming unit-erythroid</i>)
CHGM	Concentração de hemoglobina globular média
CRP	Proteína C-reativa (<i>C-reactive protein</i>)
CVC	Cateter venoso central
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfatado
DRC	Doença renal crónica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELANE	Elastase neutrofílica (gene)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAV	Fístula arteriovenosa
GM-CSF	Fator estimulante de colónias de granulócitos-monócitos (<i>granulocyte-monocyte colony stimulating factor</i>)
HDLc	Colesterol das lipoproteínas de alta densidade
HGM	Hemoglobina globular média
HLA-DR	<i>Human leucocyte antigen-heterodimer DR</i>
HMWAg	Agregados de elevado peso molecular (<i>high molecular weight aggregates</i>)
HRP	<i>HorseRadish Peroxidase</i>
IECAs	Inibidores da enzima de conversão da angiotensina
IFN-γ	Interferão- γ
IκBα	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
IL	Interleucina
IPR	Índice de produção de reticulócitos

JAK-STAT	Cinase Janus transmissora de sinal e ativadora de transcrição (<i>Janus kinase-signal transducer and activator of transcription</i>)
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein-1</i>
LCAT	Lecitina colesterol acil-transferase
LDLc	Colesterol das lipoproteínas de baixa densidade
LOX-1	<i>Lectin-type oxLDL receptor 1</i>
LRA	Lesão renal aguda
MDA	Malondialdeído
min	minutos
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NGAL	Lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (<i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>)
NKF-KDIGO	<i>National Kidney Foundation – Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2 - fator relacionado 2 (<i>nuclear factor erythroid-2-related factor-2</i>)
oxLDL	Lipoproteínas de baixa densidade oxidadas
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogénio-1 (<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pfrag	Fragmentos proteolíticos (<i>proteolytic fragments</i>)
PON-1	Paraoxonase-1
PTFE	Politetrafluoroetileno
PTH	Hormona da paratiroide
RDW	Coeficiente de distribuição de glóbulos vermelhos (<i>red cell distribution width</i>)
rhEPO	Eritropoietina recombinante humana
ROS	Espécies reativas de oxigénio (<i>reactive oxygen species</i>)
SCA	Síndrome coronário agudo
SERPINA1	<i>Serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1</i>
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SOD	Superóxido dismutase
SPSS®	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
sTfR	Recetor solúvel de transferrina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TAS	Capacidade antioxidante total (<i>total antioxidant status</i>)

Tf	Transferrina
TFG	Taxa de filtração glomerular
TGF-β	Fator de crescimento transformador- β (<i>transforming growth factor-β</i>)
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
tPA	Ativador de plasminogénio tecidual (<i>tissue plasminogen activator</i>)
URR	Razão de redução de ureia
UV	Ultravioleta
VGM	Volume globular médio

I. Introdução

I. Introdução

1. Anatomia e função renal

Os rins são órgãos vitais que desempenham uma variedade de funções importantes no organismo, nomeadamente, na manutenção da homeostasia hidro-eletrolítica, no controlo da pressão sanguínea, no equilíbrio ácido-base e na excreção de drogas e produtos potencialmente tóxicos, resultantes do metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos (ureia, ácido úrico), através da urina. (1,2) Localizados no espaço retroperitoneal, de ambos os lados da coluna vertebral, os rins estão envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo e apresentam duas regiões distintas, uma mais externa, o córtex, e outra mais interna, a medula. Estas regiões são compostas por milhões de estruturas tubulares microscópicas designadas por nefrónios, sendo estes as unidades funcionais dos rins (Figura 1-A). Cada nefrónio é constituído por cinco partes, responsáveis pelos processos de filtração, reabsorção e secreção dos rins: (i) o glomérulo, rodeado pela cápsula de Bowman, onde ocorre a filtração do sangue proveniente da arteríola aferente, (ii) o túbulo contornado proximal, (iii) a ansa de Henle e (iv) o túbulo contornado distal, responsáveis pela reabsorção de água, metabolitos e eletrólitos para a corrente sanguínea e, por último, (v) o tubo coletor, local final de concentração ou diluição da urina, por excreção de determinadas substâncias e de água, antes de ser conduzida até à bexiga (Figura 1-B). (1)

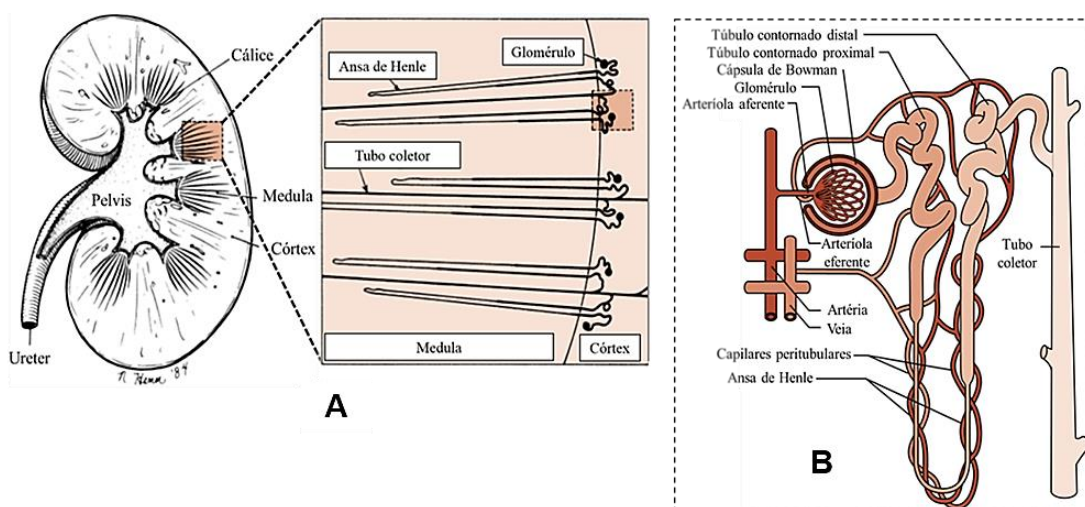


Figura 1 - Anatomia do rim (A) e do nefrónio (B) [adaptado de (1)].

Introdução

Para além das funções mencionadas, os rins são também glândulas endócrinas, sendo o local primário de produção de determinadas hormonas, nomeadamente, de eritropoietina, responsável pela regulação da eritropoiese, de renina, interveniente no sistema renina-angiotensina-aldosterona que regula a reabsorção de sódio a nível renal, e de 1,25-dihidroxitamina D₃, essencial para o equilíbrio do cálcio e do fosfato e para a calcificação óssea no organismo. (1,2)

1.1. Avaliação da função renal

Atualmente existem vários testes disponíveis para avaliação da função renal e para a monitorização de patologias renais, sendo a depuração ou *clearance* de creatinina e a taxa de filtração glomerular (TFG) os índices mais utilizados para este efeito. (2)

A creatinina é um produto resultante da utilização da creatina fosfato pelo músculo para obtenção de energia metabólica, é amplamente filtrada pelo glomérulo, e não é reabsorvida pelos túbulos renais. A taxa à qual a creatinina é removida do plasma para a urina é designada por *clearance* de creatinina, e é expressa em mililitros por minuto, sendo calculada com base no valor sérico de creatinina e na sua concentração na urina excretada no período de 24 horas. A partir destes dados é possível determinar a TFG, expressa em mililitros por minuto por 1,73 m² (que corresponde ao fator de normalização da área de superfície corporal), que é aceite como o melhor índice da função renal. (1)

A urianálise é um método complementar importante na avaliação da função renal, que permite a deteção de proteínas (especificamente albumina), mas também de células sanguíneas e cristais, na urina. (3) As concentrações séricas de eletrólitos, especialmente de sódio, potássio, fósforo e cálcio, podem também refletir o estado da função renal, uma vez que a sua concentração tende a aumentar quando há patologias renais que afetam as capacidades de filtração, reabsorção e/ou secreção dos rins, necessitando, no entanto, de dados e informações clínicas adicionais que permitam estabelecer uma relação entre ambos. O mesmo acontece com a *clearance* de ureia que, apesar de ser livremente filtrada pelo glomérulo, é

reabsorvida pelos túbulos renais (cerca de 40%), não podendo ser usada, por si só, como índice para avaliação da função renal. (1,2)

Na prática clínica, a proteinúria é o principal marcador da progressão de patologias renais, especialmente quando combinada com a TFG; apresenta, no entanto, algumas limitações quando se pretende avaliar o efeito de intervenções em patologias renais que podem alterar o grau da proteinúria. A TFG calculada com base nos níveis de creatinina está também associada a algumas limitações, na medida em que a concentração sérica deste metabolito tende a aumentar apenas quando a função renal se apresenta reduzida em 50%. Existem, atualmente, vários estudos clínicos em desenvolvimento que têm como objetivo a identificação e/ou validação de novos biomarcadores que possam ser utilizados como indicadores precoces e de progressão da função renal em contexto clínico. (4–6) A cistatina C e a proteína residual- β (BTP) são proteínas produzidas pelo organismo que são livremente filtradas pelo glomérulo e amplamente reabsorvidas e metabolizadas a nível tubular, e revelaram ser indicadores da redução da função renal mais sensíveis do que a creatinina, pois permitem detetar pequenas alterações na função renal mesmo dentro da chamada “zona cega” da creatinina. (5) A proteína lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL) é altamente expressa ao nível do epitélio tubular e é libertada após lesões renais, apresentando-se como um promissor indicador precoce de lesão renal aguda (LRA) e de progressão da lesão renal no caso de doença renal crónica (DRC). (6)

2. Doença renal crónica

A doença renal crónica (DRC) consiste na perda gradual e permanente da função renal com o tempo e caracteriza-se pela presença de alterações na estrutura e função renais por mais de três meses, que determinam complicações para a saúde dos indivíduos portadores desta patologia. (3) Esta doença é acompanhada pela acumulação de produtos tóxicos no organismo, nomeadamente ureia, pelo desequilíbrio nos eletrólitos e na volémia, e por alterações no equilíbrio ácido-base, que colocam em risco a sobrevivência dos doentes. Na etiologia da DRC estão presentes vários fatores que, na sua maioria, são secundários a outras doenças, como a diabetes *mellitus*, a hipertensão arterial, obesidade, doenças inflamatórias

Introdução

e virais; pode também estar associada ao uso abusivo de determinadas drogas e medicamentos, que conduzem a lesão renal. (1,7)

2.1. Diagnóstico e classificação da doença renal crónica

A *National Kidney Foundation – Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (NKF-KDIGO) propôs, em 2012, um conjunto de diretrizes para o diagnóstico, classificação da DRC e prognóstico, tendo por base a causa, a TFG e o grau de albuminúria. Esta tabela permite avaliar o risco de progressão da doença e de desenvolvimento de complicações associadas à insuficiência renal e, ainda, orientar o tratamento, por forma a diminuir esses riscos e a mortalidade (Tabela 1). (3)

Tabela 1 - Classificação da DRC, com base na TFG e no grau de albuminúria, e prognóstico da doença.

				Categorias de albuminúria		
				A1 Normal a ligeiramente aumentada <30 mg/g de creatinina	A2 Moderadamente aumentada 30-300 mg/g de creatinina	A3 Severamente aumentada >300 mg/g de creatinina
Categorias de TFG (mL/min/1,73m ²)	G1	Normal ou elevada	≥ 90			
	G2	Ligeiramente diminuída	60-89			
	G3a	Ligeira a moderadamente diminuída	45-59			
	G3b	Moderada a severamente diminuída	30-44			
	G4	Severamente diminuída	15-29			
	G5	Falha renal (fase terminal)	< 15			

Legenda: verde – risco baixo (se não existirem outros indicadores de doença renal, não há DRC); amarelo – risco moderadamente elevado; laranja – risco elevado; vermelho – risco muito elevado [adaptado de (3)].

A presença de anemia, hiperfosfatémia e hipocalcémia, devido a uma deficiente produção renal de eritropoietina e de 1,25-dihidroxitamina D₃,

respetivamente, são também dados clínicos importantes em doentes com DRC, que podem ser usados como indicadores complementares no diagnóstico desta patologia. (8,9) É habitual recorrer-se a técnicas de imagiologia e a biópsias para detetar alterações no tamanho dos rins e obstruções renais, ou em casos em que a causa da doença renal não é conhecida. (3,10)

De acordo com os resultados dos diferentes exames clínicos e análises laboratoriais referidas, o diagnóstico de DRC é confirmado quando uma ou mais das observações apresentadas na Tabela 2 são detetadas por um período superior a três meses.

Tabela 2 - Critérios para definição de DRC (qualquer um destes critérios, presente por mais de 3 meses).

Marcadores de lesão renal (um ou mais)	Albuminúria ($\geq 30\text{mg}/24\text{h}$ ou $\geq 30\text{mg/g}$ creatinina)
	Alterações no sedimento urinário (hematúria, leucocitúria, cristais, corpos de gordura)
	Alterações eletrolíticas ou outras, devidas a lesões tubulares
	Alterações histológicas
	Alterações estruturais detetadas por imagiologia (rins poliquísticos ou displásicos, presença de massas, estenose arterial renal)
	Histórico de transplante renal
TFG diminuída	TFG < 60 ml/min/1,73 m² (Categorias G3a-G5)

[adaptado de (3)]

Para além da TFG, determinada a partir da concentração de creatinina no sangue e na urina, e do grau de albuminúria, a NFK-KDIGO recomenda a determinação da TFG a partir da concentração sérica de cistatina C para confirmação do diagnóstico de CKD, quando a TFG (obtida a partir da concentração de creatinina) é de 45-59 mL/min/1,73m² e o doente não apresenta outros indicadores de lesão renal. (3)

2.2. Terapêutica da doença renal crónica

Quando a DRC é diagnosticada, deverá ser iniciado um conjunto de medidas terapêuticas para tratamento ou diminuição da progressão da doença.

A diabetes é a principal causa de DRC a nível mundial. Cerca de 40% dos doentes com diabetes tipo 1 desenvolve DRC, constituindo este um fator de risco independente de morte precoce por doenças cardiovasculares. (11) De acordo com os dados da Sociedade Portuguesa de Nefrologia, em 2014, cerca de 32,2% dos doentes incidentes e 27,8% dos doentes prevalentes com DRC em Portugal, apresentam a diabetes como a principal causa etiológica desta patologia renal. (12) A hiperglicemia apresentada por estes doentes implica a excreção renal de grande volume de urina hiperosmótica que, a longo prazo, determina a lesão dos glomérulos e o desenvolvimento de DRC. A albuminúria e a hipertensão que acompanham a DRC contribuem para o agravamento da lesão renal. (1) A taxa de mortalidade dos doentes com nefropatia diabética pertencentes à categoria A3 de albuminúria, é mais de duas vezes superior à dos doentes com valores normais de albumina na urina. Assim, com vista a prevenir ou retardar a progressão das complicações microvasculares e renais em doentes diabéticos com DRC, é aconselhável manter uma taxa de hemoglobina glicada de aproximadamente 7% e monitorizar a pressão arterial. (3)

A hipertensão arterial é a segunda causa de DRC em Portugal, e é considerada, simultaneamente, um fator de predisposição e uma consequência da DRC, uma vez que resulta do aumento da volémia, determinada pela deficiente excreção renal de sódio e de água, e contribui para o agravamento da insuficiência renal e para o desenvolvimento de problemas cardiovasculares. (12) Ao doente hipertenso com DRC, é recomendada a utilização de medicação para normalização da pressão sanguínea, que pode incluir inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECAs) ou bloqueadores dos recetores da angiotensina-II, promovendo o bloqueio do sistema renina-angiotensina-aldosterona e, consequentemente, diminuindo a reabsorção renal de água e sódio, bem como o efeito vasoconstritor da angiotensina-II. (1,7,13) Adicionalmente, é aconselhável a diminuição da ingestão diária de proteínas e de sal, para reduzir a produção de

ureia e os consequentes efeitos nocivos da acumulação deste metabolito e do sódio, respetivamente, no organismo. (3)

Os doentes com DRC desenvolvem, frequentemente, anemia e hiperparatiroidismo secundário, como consequência da diminuição da produção renal de eritropietina e de 1,25-dihidroxitamina D₃, respetivamente. Esta última é responsável pela indução da reabsorção renal de cálcio e pela excreção de fósforo. Uma vez diminuída, desenvolve-se hipocalcémia e hiperfosfatémia, que funcionam como dois fatores estimulantes para a produção contínua da hormona da paratiroide (PTH), na tentativa de restabelecer a homeostasia destes dois eletrólitos, através da reabsorção renal e intestinal de cálcio, bem como da libertação deste a partir das reservas ósseas. (9) Com o tempo, as células da paratiroide tornam-se hiperplásicas, desenvolvendo hiperparatiroidismo secundário, que culmina com a lesão do tecido ósseo e desenvolvimento de osteopatologias. (1,7,9) Face a estas alterações, é aconselhável determinar pelo menos uma vez os níveis séricos de fosfato, cálcio e de PTH em doentes na categoria G3b-G5 de TFG, e prescrever suplementos de vitamina D perante níveis aumentados de PTH. Já na presença de anemia, a eritropoiese deverá ser estimulada pela administração de eritropoietina recombinante humana (rhEPO).

Quando os tratamentos tradicionais falham e surgem sintomas associados à insuficiência renal ou quando o controlo da pressão sanguínea e da volémia se revelam ineficientes, deve ser iniciada a terapia de substituição renal que é imprescindível para a sobrevivência dos doentes em fase terminal, e que pode incluir diálise (peritoneal ou hemodiálise) ou o transplante renal. A hipótese de transplante deve ser considerada quando a TFG atinge a categoria G4 e quando associada a evidências de progressão irreversível da DRC para os 6-12 meses seguintes. (3)

2.3. A hemodiálise no tratamento da doença renal crónica terminal

Quando a função renal se deteriora desenvolvendo um conjunto de complicações potencialmente fatais, que podem conduzir a acidose metabólica, arritmias cardíacas, fadiga, encefalopatia e subnutrição, surge a necessidade de

hemodiálise, com o objetivo de eliminar os metabólitos tóxicos, corrigir os distúrbios eletrolíticos e ácido-base e manter a volêmia dentro de valores normais. A hemodiálise melhora a qualidade de vida e diminui as taxas de mortalidade e morbidade dos doentes com DRC terminal. (14)

2.3.1. Procedimento hemodialítico

A hemodiálise envolve a utilização de um dialisador, constituído por dois compartimentos separados por uma membrana semipermeável sintética biocompatível, através da qual ocorre o movimento de solutos e de água entre o sangue do paciente e a solução de diálise, que fluem em sentidos opostos. O movimento destas substâncias pode ocorrer segundo três grandes mecanismos: (i) difusão, (ii) ultrafiltração e (iii) convecção. Por difusão, os solutos atravessam a membrana semipermeável do local de maior concentração para o de menor concentração, sendo removidas pequenas moléculas ou substâncias, como os eletrólitos, por este mecanismo. A ultrafiltração é responsável pela remoção do excesso de água do sangue, por diferença de pressão entre os dois lados da membrana. Por convecção, os solutos são arrastados através da membrana, à medida que a água se move a favor de um gradiente de pressão (hemofiltração). (15,16) Atualmente existem processos de diálise que incluem a remoção de água e solutos através da combinação dos fenómenos de difusão e de convecção, sendo designados por hemodiafiltração. (17)

As membranas de diálise utilizadas, de celulose ou polissulfona, são biocompatíveis e podem ser de baixo-fluxo ou de alto-fluxo, conforme a porosidade que apresentam. As primeiras apresentam um poder de filtração de moléculas de peso molecular abaixo dos 5 KDa, enquanto as segundas permitem a eliminação de moléculas com pesos moleculares superiores. (10) Em alternativa ao uso de membranas sintéticas, pode ser realizada a diálise peritoneal, que utiliza o peritонеu do doente como membrana semipermeável através da qual a água e os solutos se difundem, com a vantagem de ser totalmente biocompatível.

Para além do dialisador, o circuito de hemodiálise apresenta, ainda, uma bomba de sangue rotatória, detetores e eliminadores de ar, uma bomba de heparina

para prevenir a coagulação do sangue e monitores de pressão arterial e venosa (Figura 2). (15)

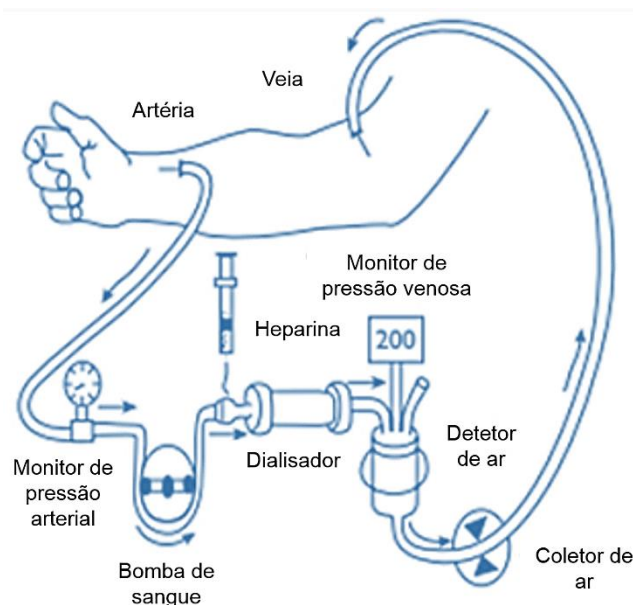


Figura 2 - Circuito de hemodiálise [adaptado de (15)].

A hemodiálise é realizada em clínicas e hospitais, habitualmente três vezes por semana, durando três a quatro horas, podendo a diálise peritoneal ser realizada em casa, com a mesma periodicidade. (14) O tempo de cada tratamento pode, no entanto, variar de acordo com as necessidades de cada paciente e com a eficiência da hemodiálise. Esta é regularmente determinada pelo cálculo da *clearance* de ureia no fim do tratamento, usando a fórmula Kt/V (K : coeficiente de *clearance* de ureia durante o tratamento; t : tempo de hemodiálise; V : volume de distribuição de ureia), sendo o valor ideal igual ou superior a 1,3. Se o Kt/V for inferior a este valor, o tempo de hemodiálise tem de ser aumentado, de forma a cumprir os objetivos deste procedimento. (15) Na avaliação da eficiência da hemodiálise pode, ainda, ser utilizada a razão de redução de ureia (URR), que se encontra matematicamente relacionada com o Kt/V . A URR é determinada apenas com base na concentração plasmática de ureia pré- e pós-diálise, sendo normalmente apresentada em percentagem. O valor mínimo ideal para a URR é de 65%. (18)

2.3.2. Acesso vascular para hemodiálise

Antes de se iniciar a hemodiálise é necessário obter um acesso vascular funcional. Atualmente existem três tipos de acesso vascular, nomeadamente, a fístula arteriovenosa (FAV), o enxerto arterial de politetrafluoroetileno (PTFE) e o cateter venoso central (CVC). A FAV consiste na formação de uma ligação arteriovenosa, sendo a primeira escolha de acesso vascular, dado o baixo risco de infeção e trombose associado. No entanto, este tipo de acesso vascular apresenta, por vezes, complicações, por incorreta maturação da fístula ou por desenvolvimento de estenose venosa seguida de trombose, numa fase mais avançada. Nos casos em que não é possível obter uma FAV funcional, o CVC surge como a única opção, sendo, no entanto, o tipo de acesso vascular menos desejado (19), pois tem sido associado a uma maior taxa de mortalidade, que parece estar relacionada com um processo inflamatório exacerbado e com a disfunção endotelial. (20) Por último, quando na cirurgia para formação da FAV não é encontrada uma veia com calibre e comprimento suficientes, pode ser feito facilmente um enxerto de PTFE entre vasos nativos, que permite prontamente a sua utilização como acesso vascular. Estes enxertos de PTFE apresentam problemas de biocompatibilidade, aumentando o risco de trombose, estenose e infeção nos doentes. (15,19) Nos últimos 30 anos não existiram avanços significativos nesta área, fazendo da disfunção do acesso vascular uma das causas mais importantes para a morbilidade apresentada pelos doentes hemodialisados. (19)

3. Complicações associadas à doença renal crónica terminal

A doença renal crónica terminal é um problema crescente de saúde pública com uma prevalência mundial cada vez maior. Apesar dos avanços verificados nos últimos anos nos procedimentos de hemodiálise e no apoio médico, os doentes hemodialisados apresentam uma taxa de mortalidade elevada que excede a apresentada pela população geral. (21) Têm sido descritas várias complicações que podem estar associadas à elevada taxa de morbilidade e mortalidade nestes doentes, nomeadamente anemia, inflamação, ativação de leucócitos, alterações no

metabolismo do ferro, *stress* oxidativo e lesão de eritrócitos, as quais estão muitas vezes relacionadas entre si e podem favorecer o desenvolvimento de outras patologias, como doenças cardiovasculares, uma das principais causas de mortalidade nestes doentes. (22)

3.1. Inflamação e ativação de leucócitos

A inflamação consiste numa resposta fisiológica a uma grande variedade de estímulos nocivos, como lesão de tecidos ou infeções, que envolve a participação de várias células e moléculas, tendo como objetivo o restabelecimento da homeostasia do organismo. (23) A resposta inflamatória pode constituir um processo localizado, ou determinar alterações sistémicas distantes do local afetado, referidas como “resposta de fase aguda”, que originam sintomas como febre, perda de apetite e sonolência. Para além destas manifestações associadas a alterações neuroendócrinas, a resposta de fase aguda promove a ativação de células inflamatórias, alterações metabólicas (aumento da produção hepática de proteínas de fase aguda) e hematopoiéticas (leucocitose). (10,23)

O estímulo inflamatório induz a ativação de macrófagos e outros leucócitos, e a consequente libertação de mediadores peptídicos de baixo peso molecular, designados genericamente por citocinas, que são também segregadas por outras células, tais como, células endoteliais e fibroblastos. As citocinas são produzidas como resultado da ativação do fator de transcrição NF- κ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) (Figura 3) e podem ser divididas em três grandes grupos: (i) as que atuam como fatores de crescimento positivos ou negativos para várias células [e.g., interleucina (IL) -2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12, fator estimulante de colónias de granulócitos-monócitos (GM-SCF)]; (ii) citocinas com propriedades pro-inflamatórias [e.g., fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-1, IL-6, interferão- γ (IFN- γ) e IL-8], responsáveis pelo aumento do catabolismo muscular, da produção de proteínas de fase aguda e da síntese de prostaglandinas, leucotrienos e óxido nítrico; e (iii) fatores com atividade anti-inflamatória (e.g., antagonistas dos recetores de IL-1, proteínas de ligação do TNF- α e da IL-1). (23,24) A ação das citocinas pró-inflamatórias sobre o fígado resulta

Introdução

no aumento da síntese de proteínas de fase aguda positivas, como a proteína C-reativa (CRP), o peptídeo amiloide A e o fibrinogénio, bem como na supressão da síntese de proteínas de fase aguda negativas, de que é exemplo a albumina e a transferrina. (23)

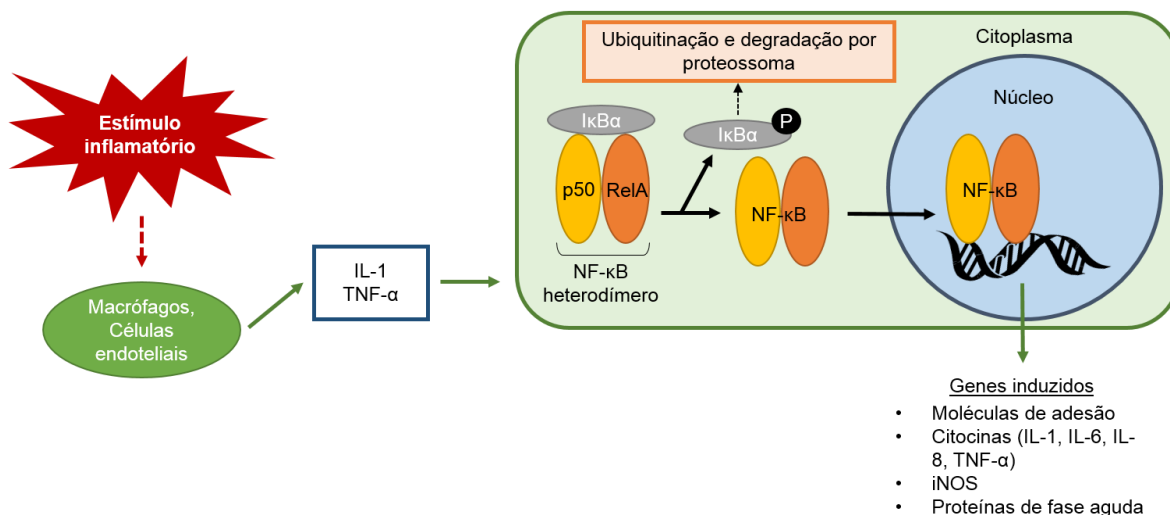


Figura 3 - Produção de proteínas e substâncias pró-inflamatórias pela ativação do fator de transcrição NF-κB. Na maioria das células o fator NF-κB existe como um heterodímero (p50/RelA) no citoplasma, estando associado a um inibidor, o IκBα (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha). Após um estímulo inflamatório, as células inflamatórias ativadas produzem citocinas que, por ligação a recetores membranares de leucócitos e de outras células (por exemplo, hepatócitos), induzem um mecanismo de sinalização intracelular que resulta na fosforilação do IκBα e na sua posterior ubiquitinação e degradação por proteossomas. O heterodímero NF-κB uma vez livre, é translocado para o núcleo onde promove a transcrição de vários genes que codificam citocinas, proteínas de fase aguda, moléculas de adesão e outras substâncias pró-inflamatórias [adaptado de (23)].

Dentro do grupo das proteínas de fase aguda, a CRP foi a primeira a ser descrita, em 1930, (25) e é responsável pelo reconhecimento e eliminação de algumas bactérias e células lesadas, e pela ativação do sistema de complemento, funcionando, também, como opsonina para auxiliar na fagocitose de agentes patogénicos. A IL-6 é o principal mediador para a produção hepática desta proteína, ligando-se a recetores membranares presentes nos hepatócitos e promovendo a transcrição do gene que a codifica. Assim, dado o seu papel fundamental no processo inflamatório, a IL-6 e a CRP são frequentemente utilizadas como

marcadores de inflamação, apresentando valores séricos elevados em estados inflamatórios. (24,26)

Para além do aumento da síntese de proteínas de fase aguda, as citocinas pró-inflamatórias induzem a expressão membranar de moléculas de adesão, nomeadamente seletinas e integrinas, em células endoteliais e leucócitos, promovendo a mobilização de leucócitos e direcionando-os para a zona afetada. Estas proteínas interagem entre si, permitindo o movimento dos leucócitos ao longo das paredes dos vasos sanguíneos e mediando a sua migração, por quimiotaxia e diapedese, através das células endoteliais para o foco da inflamação. (23)

Quando ativados, em caso de infeção ou inflamação, os neutrófilos desencadeiam uma grande variedade de mecanismos dependentes e não dependentes de oxigénio. Os primeiros incluem a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), em particular, o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que atua como um oxidante resultante da ativação do complexo enzimático membranar nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase. Já os mecanismos não dependentes de oxigénio envolvem a desgranulação dos neutrófilos ativados, com libertação de proteases e proteínas catiónicas, nomeadamente a elastase e a lactoferrina, respetivamente. (27)

A elastase é uma serina protease, membro da superfamília da quimiotripsina, que é produzida por células precursoras da linhagem mieloide e armazenada nos grânulos primários dos neutrófilos, sendo responsável pela degradação dos microrganismos fagocitados. (28) Esta protease é também capaz de degradar proteínas da matriz extracelular (como a elastina) e proteínas intervenientes na coagulação e do sistema de complemento, remodelar os tecidos lesados e facilitar a migração dos neutrófilos através dos tecidos. Para além disso, a elastase modula a expressão endotelial de citocinas, nomeadamente da IL-6, IL-8, fator de crescimento transformador- β (TGF- β) e GM-CSF, promovendo ainda, a degradação da IL-1, TNF- α e IL-2. (10,27,28) A lactoferrina, um dos constituintes das granulações específicas das células neutrofílicas, é uma glicoproteína maioritariamente proveniente dos neutrófilos, que exerce uma grande variedade de funções na defesa primária contra bactérias, fungos, protozoários e vírus. (29) Tem a capacidade de se ligar ao ferro livre presente no sangue, sendo posteriormente

Introdução

captada por macrófagos ativados que expressam recetores membranares específicos para esta proteína, inibindo, assim, o desenvolvimento dos microrganismos que dependem deste oligoelemento. A lactoferrina desempenha também um papel na regulação da resposta inflamatória e da adesão celular. (27,29)

A inflamação é comum em doentes hemodialisados, apresentando níveis elevados de marcadores de inflamação, nomeadamente, CRP e IL-6, não havendo, no entanto, um conhecimento claro dos mecanismos subjacentes à resposta inflamatória. (20,21,27,30) O procedimento de hemodiálise parece contribuir para o processo inflamatório, promovendo a ativação e a desgranulação de neutrófilos, com aumento da elastase e da lactoferrina plasmáticas, que poderão contribuir para a amplificação desse processo. (21) Foi também evidenciado que a hemodiálise promove a ativação de monócitos, com diminuição da expressão do CD14 (*cluster of differentiation 14*) e aumento do HLA-DR (*human leucocyte antigen-heterodimer DR*), associados à regulação da resposta imunitária. (30) Esta técnica terapêutica possui, de facto, várias causas passíveis de desencadear uma resposta inflamatória, nomeadamente, por ativação do sistema de complemento. A biocompatibilidade com a membrana do dialisador e a contaminação bacteriana do dialisato, são outros fatores a considerar. (20,30) No entanto, a hemodiálise parece não ser o único fator responsável pela ativação do processo inflamatório, uma vez que os doentes com DRC que ainda não iniciaram este tratamento apresentam também marcadores inflamatórios elevados, que tendem a aumentar após o início da hemodiálise. (10,31) Foram evidenciados níveis exacerbados de IL-6, IL-12 e de recetores solúveis de IL-2 em doentes com uremia, demonstrando que a DRC corresponde, por si só, a um estado de inflamação crónica. (26)

A eliminação de muitas das citocinas que são produzidas durante o processo inflamatório é assegurada pelos rins. Uma vez que a filtração renal dos doentes com DRC se encontra deteriorada, estas citocinas acumulam-se no organismo, promovendo, assim, o exacerbamento e prolongamento da resposta inflamatória. (31) Até agora, as estratégias utilizadas para tentar atenuar o estado inflamatório dos doentes hemodialisados passavam pela prevenção da libertação dos mediadores inflamatórios induzida pelo procedimento de diálise, através da

utilização de membranas biocompatíveis e de soluções de diálise livres de contaminantes. Uma nova alternativa consiste na remoção das citocinas circulantes através do próprio tratamento de diálise. (32) No entanto, existem alguns fatores limitantes nesta abordagem: as membranas de alto-fluxo utilizadas atualmente não permitem a filtração das citocinas, dado o seu peso molecular (15-30 KDa) e a sua difusão lenta; estes mediadores podem ligar-se a proteínas plasmáticas, como a α_2 -macroglobulina, o que dificulta a sua remoção; o tempo de semi-vida das citocinas é baixo, e a depuração extracorporeal pode não aumentar a eliminação endógena. (31,33,34) Tendo por base estas limitações, começam a ser utilizadas novas membranas de poro largo, associadas à hemofiltração continuada, que facilitam a remoção das citocinas, com perdas aceitáveis de albumina, tendo em conta a carga, a hidrofobicidade e a ligação a proteínas transportadoras. (32,35) Apesar de parecerem seguras em ensaios, estas membranas necessitam de estudos clínicos adicionais. (31,32)

3.1.1. Inflamação, doenças cardiovasculares e anemia associada à doença renal crónica

A inflamação crónica apresentada pelos doentes com DRC contribui para o desenvolvimento de problemas cardiovasculares, e ainda para o agravamento da anemia que os caracteriza. De facto, vários estudos evidenciaram um elo de ligação entre inflamação, doenças cardiovasculares e doença renal. (19,22,36) Efetivamente, a inflamação sistémica está associada a lesão do endotélio vascular, que é um fator de risco, quer para o síndrome coronário agudo (SCA), quer para a progressão da DRC. Os doentes em tratamento de hemodiálise apresentam níveis elevados de D-dímeros (resultantes da degradação da fibrina pela plasmina) e da razão tPA/PAI-1 (ativador de plasminogénio tecidual/inibidor do ativador de plasminogénio-1), sugerindo um estado pró-coagulante, fibrinolítico e de disfunção endotelial. (19,20) Os doentes com DRC apresentam também valores elevados de CRP, o que constitui um importante indicador de risco cardiovascular e de valor no prognóstico. (36)

Estudos recentes identificaram a dimetilarginina assimétrica (ADMA) como um novo marcador de disfunção endotelial associada à lesão renal. (37,38) A ADMA é um aminoácido que inibe a óxido nítrico sintase e que, quando produzido em grandes quantidades, promove a diminuição da produção de óxido nítrico. Valores séricos elevados de ADMA têm sido associados a redução da TFG, albuminúria e CRP aumentadas em doentes com DRC, evidenciando o envolvimento da inflamação e da disfunção endotelial na lesão vascular renal. (4,37,38) A disfunção endotelial e o aumento da volémia, associados ao processo inflamatório, parecem contribuir para a falha cardíaca e para o enfarte do miocárdio. (22) Esta relação entre os problemas cardiovasculares e a inflamação explicam o facto de muitos dos doentes que dão entrada no hospital por enfarte do miocárdio apresentarem também disfunção renal no momento de admissão. (36)

A anemia é uma das complicações mais comuns associadas à DRC e é diagnosticada quando a concentração de hemoglobina é inferior a 13,5 g/dL em homens, e inferior a 11,5 g/dL em mulheres. (3) A monitorização da concentração de hemoglobina deve ser realizada, quando clinicamente indicado em doentes nas categorias G1-G2 de TFG, anualmente para as categorias G3a-G3b, e pelo menos duas vezes por ano se são atingidas as categorias G4-G5. Atualmente, o tratamento da anemia nestes doentes é feito por administração de rhEPO, que promove uma correção significativa do estado anémico. No entanto, existe uma grande variabilidade na resposta a esta terapia, e cerca de 5-10% dos doentes desenvolvem resistência à rhEPO. (21) Foram encontrados níveis séricos elevados de marcadores de ativação de neutrófilos e de monócitos, bem como de marcadores de inflamação, em doentes hemodialisados que apresentam resistência à rhEPO, quando comparados com doentes sensíveis a esta terapia. Este facto sugere que a inflamação pode ser um fator interveniente nesta resistência. (20,21,26,30) Uma das hipóteses propostas é que o IFN- γ e o TNF- α produzidos durante o processo inflamatório, resultantes da ativação de monócitos e linfócitos T, possam atuar como agentes pró-apoptóticos sobre as células progenitoras eritroides da medula óssea, como as unidades formadores de colónias eritroides (CFU-E), promovendo a sua morte precoce e antagonizando o efeito anti-

apoptótico da rhEPO (Figura 4). (26) Embora esta hipótese esteja de acordo com resultados de vários trabalhos, (39–41) são necessários mais estudos.

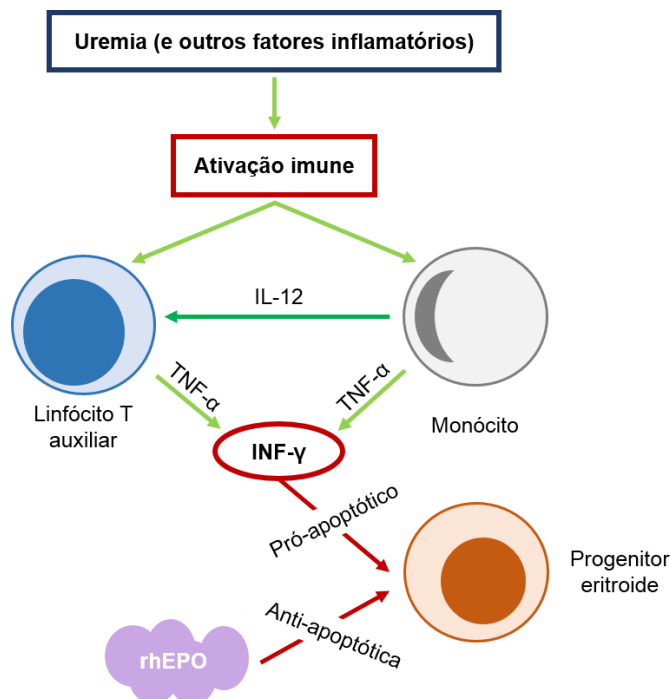


Figura 4 - O papel da inflamação na resistência à rhEPO. A uremia, bem como fatores associados à hemodiálise, promovem a ativação de monócitos e linfócitos T. Estas células imunitárias são responsáveis pela liberação de citocinas que promovem a produção de $TNF-\alpha$ e $INF-\gamma$ que, por sua vez, atuam no nível das células progenitoras eritroides da medula óssea ativando vias apoptóticas que antagonizam o efeito estimulante da rhEPO [adaptado de (26)].

A inflamação determina também alterações ao nível do metabolismo do ferro, que podem contribuir para o agravamento da anemia/resistência à rhEPO na DRC.

3.1.2. Alterações no metabolismo do ferro

O ferro é um oligoelemento essencial para o crescimento e desenvolvimento do organismo, fazendo parte da constituição de várias proteínas e enzimas, como a hemoglobina, mioglobina, citocromos, NADH desidrogenase e fosfatases, sendo imprescindível em diferentes funções biológicas. Em contrapartida, o excesso de ferro no organismo envolve vários riscos, dada a sua capacidade para gerar

Introdução

espécies reativas de oxigénio (ROS) e para se depositar a nível de diferentes órgãos e sistemas, determinando a sua disfunção e/ou falência. (42) Este efeito duplo requer uma regulação estreita dos níveis séricos de ferro que, nos humanos, dada a inexistência de uma via de excreção, só é conseguida através da sua absorção intestinal, dependente dos níveis de ferro armazenado no organismo e da quantidade necessária para a eritropoiese. (10,42) O ferro, que é absorvido a nível intestinal, é transportado para a membrana apical dos enterócitos, onde se liga à ferroportina, uma proteína expressa na membrana dos enterócitos, macrófagos e hepatócitos. Após oxidação do ferro pela hefaestina, este liga-se à transferrina (Tf), sendo conduzido até aos locais de armazenamento (principalmente no fígado sob a forma de ferritina) ou de utilização (maioritariamente nos precursores eritroides da medula óssea para a eritropoiese), nos quais as células possuem recetores específicos para esta proteína plasmática. Estes processos de absorção e distribuição de ferro pelo organismo possuem várias fases e intervenientes, tendo, no entanto, um regulador central: a hepcidina. (42,43)

A hepcidina é uma hormona peptídica de baixo peso molecular, que é produzida pelo fígado em resposta a níveis elevados de ferro. É sintetizada inicialmente sob a forma de pré-prohepcidina, com 84 aminoácidos, sendo posteriormente clivada, originando a prohepcidina com 60 aminoácidos que, após uma segunda clivagem, origina a hepcidina, com 25 aminoácidos. O único alvo molecular desta proteína é a ferroportina. A hepcidina promove a internalização deste transportador, que é posteriormente degradado em endolisossomas, impedindo que o ferro que é absorvido pelos enterócitos, e aquele existente em macrófagos e outras células de armazenamento, seja absorvido ou mobilizado, determinando, portanto, uma diminuição da concentração sérica de ferro e uma redução da sua disponibilidade para a eritropoiese. (43)

A IL-6, que é produzida durante um processo inflamatório, é também um regulador da síntese de hepcidina, induzindo a síntese hepática desta hormona. Esta citocina liga-se a recetores do tipo tirosina-cinase na superfície dos hepatócitos, ativando a via JAK-STAT (cinase Janus transmissora de sinal e ativadora da transcrição) intracelular, que induz a expressão de vários genes, nomeadamente o da hepcidina (Figura 5). (44) Este aumento da expressão de

hepcidina durante a inflamação leva ao sequestro de ferro nos macrófagos e à diminuição da sua absorção intestinal, o que explica a redução de ferro sérico observada durante os estados inflamatórios e que constitui um dos mecanismos de defesa do organismo contra microrganismos invasores. (10,27)

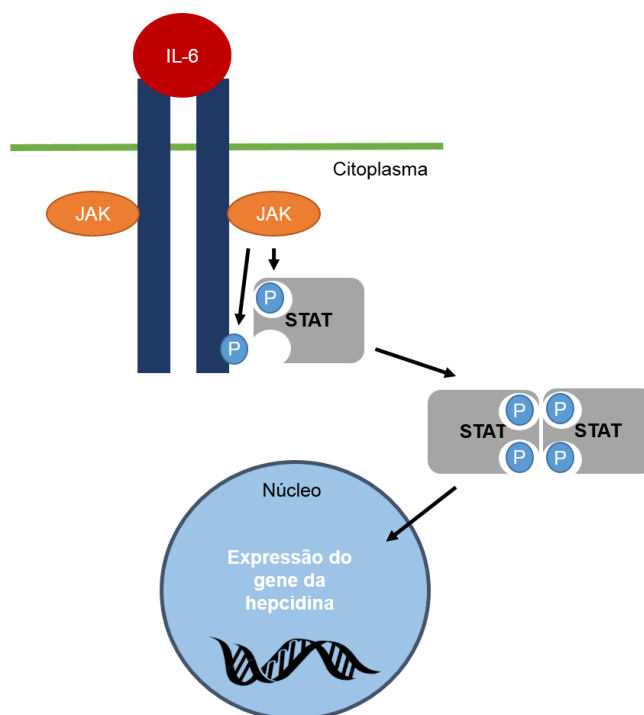


Figura 5 - Aumento da expressão do gene da hepcidina por ação da IL-6. A ligação da IL-6 ao recetor membranar nos hepatócitos conduz à fosforilação das STAT pelas JAKs. Consequentemente, as STAT dimerizam e são posteriormente translocadas para o núcleo, onde promovem a transcrição do gene da hepcidina [adaptado de (10)].

Uma vez que a inflamação regula a síntese de hepcidina, os doentes hemodialisados, que apresentam um estado inflamatório constante, possuem alterações acentuadas a nível do metabolismo do ferro. Foram encontrados valores aumentados de ferritina, de recetores solúveis de transferrina e de saturação de transferrina no plasma destes doentes, em oposição aos níveis diminuídos de transferrina e ferro livre, como resultado da elevada concentração de IL-6 e, consequentemente, de hepcidina. (20) Este processo leva à acumulação de ferro nos tecidos e potencia o estado anémico que é observado em doentes com DRC, uma vez que condiciona o processo de eritropoiese, pela redução de ferro. Por

outro lado, a anemia e a eritropoietina (usada no tratamento de dos doentes em hemodiálise), regulam também a síntese de hepcidina, inibindo-a. (20,44)

3.2. Stress oxidativo

O estado inflamatório está habitualmente associado ao desenvolvimento de stress oxidativo. Este é definido como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, por aumento da produção de ROS ou por redução da atividade antioxidante. Se não for devidamente regulada, a produção destas espécies potencialmente nocivas pode promover lesões oxidativas em vários tipos de biomoléculas, nomeadamente lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, que podem comprometer a sua função, favorecendo o desenvolvimento de patologias. (45)

A principal fonte endógena de ROS é a fosforilação oxidativa que ocorre na membrana mitocondrial interna, a qual é responsável pela produção do anião superóxido. Este pode ser convertido pela superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que é menos reativo e possui menor poder oxidante. Esta molécula, na presença de iões metálicos, como o ferro, pode ser convertida no radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) (Figura 6), outra espécie altamente reativa com grande poder oxidativo sobre as biomoléculas. (10,45)

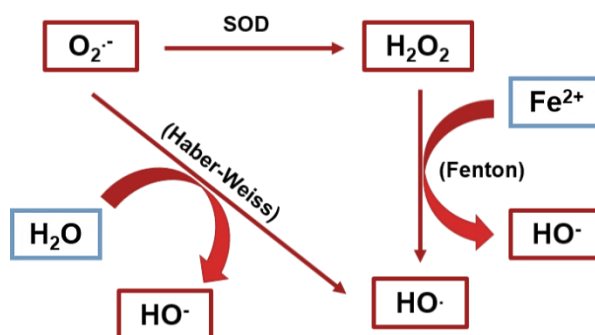


Figura 6 - Formação de ROS. A produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) a partir do anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) por ação da superóxido dismutase (SOD), e a formação do radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) a partir dos anteriores através das reações de Haber-Weiss e de Fenton na presença de ferro [adaptado de (45)].

Tal como referido, os neutrófilos são também uma importante fonte endógena de ROS. A sua ativação após um estímulo inflamatório induz a rápida

produção de aniões superóxido, peróxido de hidrogénio e de radicais hidroxilo (“explosão respiratória”), e a libertação dos constituintes granulares, tais como elastase e mieloperoxidase (MPO), para promover a morte de microrganismos invasores. Esta última enzima está envolvida no desenvolvimento de *stress* oxidativo, uma vez que a sua atividade enzimática é responsável pela produção do oxidante ácido hipocloroso. Em condições fisiológicas normais, as células são capazes de contrabalançar a formação de ROS através da ação de moléculas antioxidantes. Estas podem ser de origem enzimática, como a SOD, a glutathione peroxidase e a catalase, ou de origem não enzimática, como as vitaminas E e C, a glutathione e a coenzima Q. Quando o balanço *redox* é deslocado a favor dos oxidantes, desenvolve-se *stress* oxidativo, determinante de lesões oxidativas sobre estruturas biológicas. (46)

Na DRC o *stress* oxidativo é causado pela combinação entre o aumento da produção de ROS, acumulação de metabolitos tóxicos, ativação de leucócitos durante o processo de hemodiálise e deficiente produção de antioxidantes. (47) De facto, níveis plasmáticos elevados de malondialdeído (MDA), um metabolito resultante da peroxidação lipídica, são encontrados em pacientes com DRC, bem como uma diminuição da capacidade antioxidante total (TAS). (47–49) A redução da produção de antioxidantes parece estar relacionada com a progressiva deficiência da atividade do fator de transcrição Nrf2 (fator nuclear eritroide 2 - fator relacionado 2) que é observada na DRC. (48)

O Nrf2 desempenha um papel imprescindível na proteção contra as lesões celulares resultantes da atividade de oxidantes e de xenobióticos, na medida em que é responsável pela indução da transcrição de genes que codificam enzimas antioxidantes e detoxificantes, que incluem a catalase, a SOD e a glutathione peroxidase. Este fator de transcrição é ativado em resposta ao aumento dos níveis intracelulares de ROS e de eletrófilos, que determinam a ligação de Nrf2 a elementos de resposta antioxidante (ARE) e consequente expressão dos genes das enzimas referidas (Figura 7). Em oposição, estudos com ratos apresentando insuficiência renal crónica revelaram uma diminuição gradual no conteúdo nuclear de Nrf2, traduzindo-se num decréscimo da sua atividade, contrariamente ao que seria de esperar, visto que os mesmos apresentavam marcadores de *stress*

oxidativo aumentados. (48) Este paradoxo parece ser explicado pelo aumento simultâneo do estado inflamatório que é observado nos doentes com DRC, ou seja, pela elevada atividade do fator de transcrição NF- κ B nesta situação. Segundo a literatura, este fator de transcrição consegue reprimir diretamente a sinalização do Nrf2 a nível da transcrição (Figura 7), uma vez que ambos competem pela ligação de co-ativadores de transcrição. (50) O NF- κ B promove também a hipoacetilação local de histonas que minimizam a atividade do Nrf2 sobre os seus alvos, culminando, assim, na redução da produção dos antioxidantes naturais. (48,50)

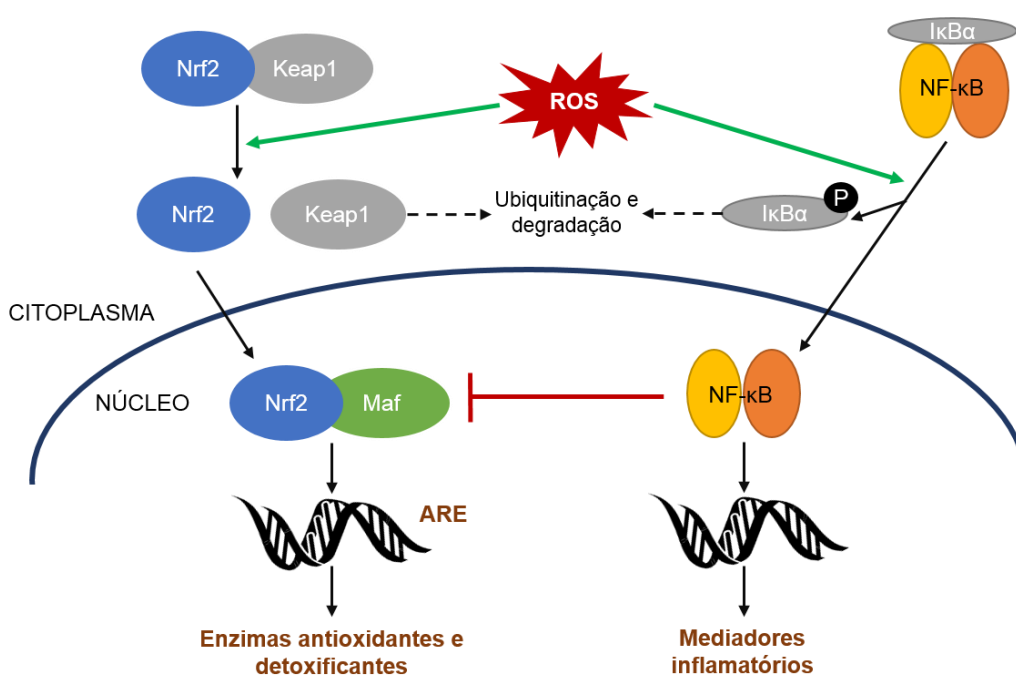


Figura 7 - Representação esquemática da ativação do Nrf2 e do NF- κ B pelas ROS. Em condições normais, o Nrf2 encontra-se inativo no citoplasma por ligação à sua molécula repressora, o Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein-1). O aumento dos níveis intracelulares de ROS promovem a dissociação do complexo Nrf2-Keap1, com a consequente ubiquitinação da Keap1 e a translocação do Nrf2 para o núcleo, onde, por ligação a elementos de resposta antioxidante (ARE), promove a ativação da transcrição dos genes correspondentes a enzimas antioxidantes e detoxificantes após associação com outros fatores de transcrição, como a Maf. Em simultâneo as ROS induzem a fosforilação do repressor I κ B α , promovendo a ativação do fator de transcrição NF- κ B e, consequentemente, a expressão de genes que codificam mediadores inflamatórios. A ativação do NF- κ B induz um efeito inibitório sobre a ação do Nrf2 [adaptado de (48)].

A combinação entre a inflamação e o *stress* oxidativo contribui para o aumento da incidência de várias patologias, nomeadamente da aterosclerose. (22,45,48,51) De facto, foi demonstrado que a DRC está associada a alterações no perfil lipídico dos doentes. Estes apresentam uma diminuição na concentração de colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDLc) e de colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDLc), bem como de proteínas associadas às HDL e às suas funções antioxidantes, como a lecitina colesterol acil-transferase (LCAT), a apolipoproteína A-1 (ApoA-1) e a paraoxonase-1 (PON-1), em oposição ao aumento da razão oxLDL/LDL (lipoproteínas de baixa densidade oxidadas/lipoproteínas de baixa densidade), que indica a presença de um estado de *stress* oxidativo. (20,51) A ligação das oxLDL aos recetores LOX-1 (*lectin-type oxLDL receptor 1*) nas células endoteliais vasculares e nos macrófagos, leva à disfunção endotelial, à indução da expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas para monócitos e neutrófilos, e promove a fagocitose das oxLDL pelos macrófagos, de que resulta um agravamento da inflamação e do *stress* oxidativo, e contribui para a formação de placas ateroscleróticas. A inflamação e o *stress* oxidativo podem, portanto, contribuir para a elevada mortalidade associada a doenças cardiovasculares na população com DRC. (51)

Com vista a minimizar o aumento do *stress* oxidativo associado à hemodiálise, foram realizados estudos preliminares nos quais foi avaliado o efeito da utilização de dialisadores com membranas revestidas com vitamina E. A presença deste antioxidante permitiu diminuir a produção de oxLDLs e de radicais livres, reduzir a ativação de leucócitos polimorfonucleares e de monócitos durante o tratamento, resultante, provavelmente, de uma maior biocompatibilidade destas membranas, relativamente às membranas convencionais de celulose. (47,52) Estudos futuros deverão ser realizados para confirmação destes resultados, e para eventual implementação destas novas membranas na hemodiálise.

3.2.1. Lesões eritrocitárias

Na DRC terminal, os eritrócitos apresentam desequilíbrios metabólicos e no estado *redox*, como resultado do *stress* oxidativo, da acumulação de metabolitos e

do aumento da taxa de auto-oxidação de hemoglobina. Durante o procedimento de hemodiálise estas células são também sujeitas a um *stress* físico e metabólico, que pode comprometer a sua integridade e conduzir, em último caso, à sua destruição. (27)

A membrana dos eritrócitos é uma estrutura complexa, que inclui uma bicamada fosfolipídica e proteínas do citoesqueleto, estando estas duas estruturas ligadas por proteínas transmembranares. O citoesqueleto é uma estrutura tridimensional de proteínas, que recobre a superfície citoplasmática da membrana dos eritrócitos. A espectrina (cadeias α e β) é o principal componente do citoesqueleto e é responsável pela integridade e deformabilidade da membrana, bem como pela forma bicôncava característica dos glóbulos vermelhos. Encontra-se ligada à membrana pelas proteínas transmembranares de ancoragem, a banda 3 e a glicoforina C, estabelecendo com estas interações verticais que envolvem, ainda, a proteína 4.2 e a anquirina. A correta ligação da espectrina com as restantes proteínas do citoesqueleto assegura as interações horizontais que, em conjunto com as interações verticais, regulam a integridade, rigidez e deformabilidade da membrana (Figura 8). (10,27,53)

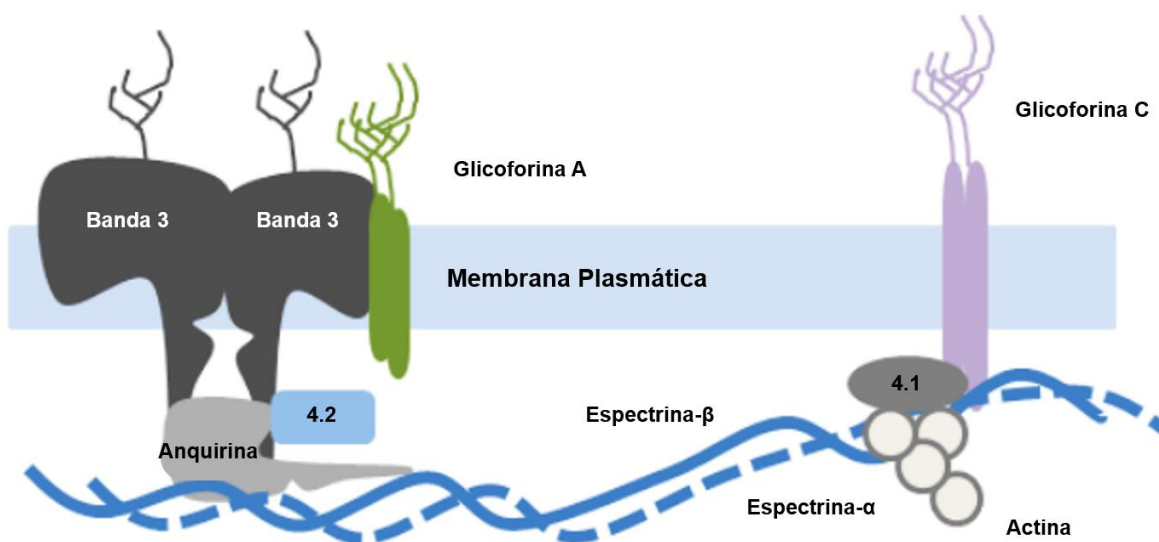


Figura 8 - Representação esquemática da membrana dos eritrócitos. Organização e localização dos diferentes tipos de proteínas que constituem a membrana celular e o citoesqueleto dos eritrócitos, e as interações que estabelecem entre si [adaptado de (27)].

Quando ocorrem perturbações a nível do metabolismo e das defesas antioxidantes dos eritrócitos, desenvolvendo-se *stress* oxidativo intracelular e podem verificar-se alterações oxidativas que marcam a célula para a morte. Este processo envolve o desenvolvimento de um neoantigénio na superfície membranar, que resulta da ligação da hemoglobina desnaturada ao domínio citoplasmático da banda 3, promovendo a sua agregação e permitindo a ligação covalente de anticorpos anti-banda 3 naturais, a ativação do sistema de complemento e, possivelmente, a fagocitose mediada por macrófagos. O perfil de banda 3 [agregados de elevado peso molecular (HMWAg), monómeros e fragmentos proteolíticos de banda 3 (Pfrag)] pode ser utilizado como marcador cumulativo de lesões oxidativas e proteolíticas dos eritrócitos e como marcador de envelhecimento, ou seja, permite diferenciar células novas, lesadas e/ou senescentes. Os eritrócitos senescentes e lesados apresentam valores elevados de HMWAg e valores baixos de Pfrag, enquanto os eritrócitos novos apresentam valores inversos para HMWAg e Pfrag. (27,54)

A ativação de leucócitos, e a consequente produção de ROS e de proteases, nomeadamente de elastase, que é observada em doentes com DRC em hemodiálise, podem promover lesões oxidativas e proteolíticas em constituintes citoplasmáticos e membranares dos eritrócitos e conduzir à sua destruição e eliminação precoce. (54) Estudos envolvendo doentes com DRC revelaram valores diminuídos de Pfrag e da razão Pfrag/monómeros de banda 3, que confirmam o aumento da lesão de eritrócitos. (49) O procedimento de hemodiálise parece promover também a diminuição da percentagem de espectrina, anquirina e das proteínas 4.1 e 4.2, bem como a redução da razão espectrina/banda 3, revelando, portanto, perturbações a nível da estrutura da membrana. (55)

A hipótese de que a elastase, que é libertada por ativação dos neutrófilos durante a hemodiálise, promove alterações a nível da membrana dos eritrócitos foi já testada. (56) Nesse estudo, eritrócitos de doentes com DRC, colhidos depois do procedimento de hemodiálise, expostos posteriormente a concentrações crescentes de elastase, não revelaram alterações na composição proteica da membrana, quando comparados com eritrócitos provenientes de indivíduos saudáveis. No entanto, eritrócitos de doentes com DRC, colhidos antes do

procedimento de hemodiálise, submetidos ao mesmo tratamento, revelaram suscetibilidade à elastase, apresentando uma diminuição das percentagens de anquirina e espectrina, e um aumento da banda 3, quando comparados com eritrócitos que não foram expostos à elastase. Estes resultados sugerem que a elastase libertada pela ativação de neutrófilos durante a hemodiálise promove, de facto, modificações a nível das proteínas membranares, que podem comprometer a integridade da membrana, favorecendo a eliminação dos glóbulos vermelhos mais lesados. Este é um fator que promove a redução do tempo de vida dos eritrócitos, funcionando como um coadjuvante para o estado anémico característico dos doentes com DRC. (27,56)

4. Atividade da elastase e polimorfismos no gene *ELANE*

A elastase deve o seu nome ao facto de ser a única, dentro de um grupo pequeno de proteases dos mamíferos, capaz de clivar a elastina a pH neutro. Esta última é uma proteína fibrosa presente na matriz extracelular de vários tecidos, nomeadamente na parede de artérias e nos pulmões, sendo responsável pela resistência e elasticidade dos mesmos. (28) A elastase apresenta um papel ambíguo no organismo. Por um lado, a sua libertação durante o processo inflamatório faz parte da defesa normal do organismo mas, por outro, o excesso de produção favorece a lesão dos próprios tecidos e o exacerbamento do estado inflamatório. (21,28,57–59) Distúrbios no equilíbrio proteolítico podem determinar o desenvolvimento de várias patologias, particularmente quando associados a estados inflamatórios crónicos, como a bronquiectasia e a doença pulmonar obstrutiva crónica. (57–59)

A elastase neutrofílica é codificada pelo gene *ELANE* presente no cromossoma 19 (19p13.3), que é constituído por cinco exões e quatro intrões, abrangendo cerca de 5000pb no DNA genómico. (28,60,61) Vários estudos recentes identificaram diferentes mutações ao nível destes exões e dos intrões 3 e 4, que parecem estar associadas à patogénese de doenças hematopoiéticas hereditárias, como a neutropenia congénita e a neutropenia cíclica. Estas mutações determinam alterações na atividade da elastase neutrofílica e é admitida a hipótese de que a acumulação de proteínas disfuncionais nas células precursoras dos

neutrófilos na medula óssea conduz, em último caso, ao desenvolvimento de *stress* do retículo endoplasmático e, conseqüentemente, à morte celular. (60–63) Na região promotora do gene *ELANE*, que apresenta seis repetições (*repetitive tandem motifs*) de 53 pb cada (exceto a 4ª repetição, constituída por 52 pb), foram identificados, até ao momento, cinco polimorfismos (Figura 9) que parecem estar relacionados com o prognóstico de algumas patologias pulmonares, e ainda com o risco de desenvolvimento de cancro do pulmão. (57–59)

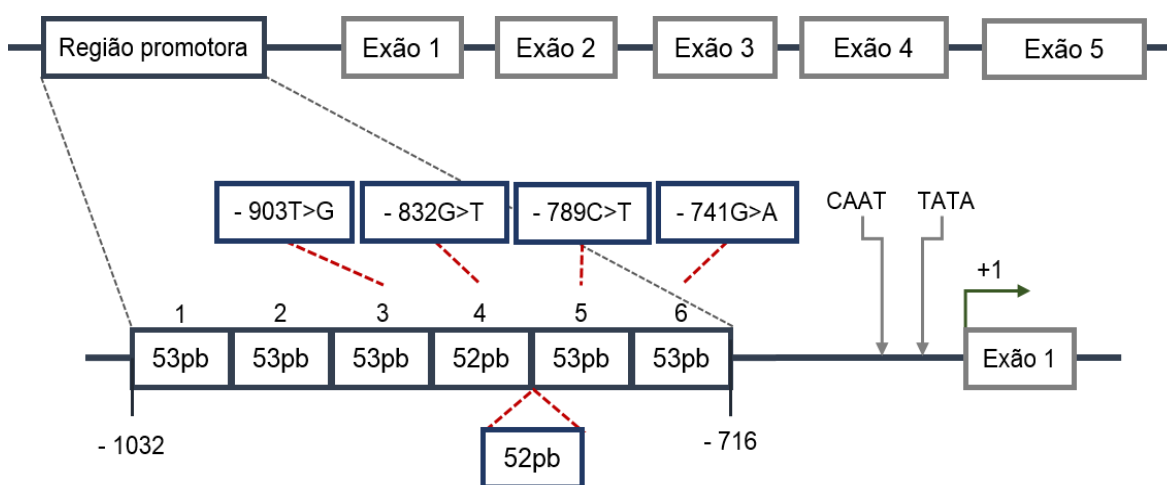


Figura 9 - Estrutura do gene *ELANE* e polimorfismos identificados na região promotora. O gene *ELANE* é constituído por cinco exões e quatro intrões. A região promotora apresenta seis repetições, nas quais estão identificados cinco polimorfismos: c.-903T>G, c.-832G>T, c.-789C>T e c.-741G>A, em relação ao local de início de transcrição (+1), e ainda uma sequência extra de 52pb entre a quarta e a quinta repetição [adaptado de (58)].

Taniguchi e colaboradores realizaram ensaios de atividade de luciferase para determinar a atividade da região promotora do gene *ELANE* com os genótipos c.-903T>G e c.-741G>A, por fusão desta região com o gene da luciferase. Concluíram que os constructos c.-903T/c.-741G apresentam maior atividade da luciferase comparativamente com os constructos c.-903G/c.-741A. Tendo em conta estes resultados, foi possível classificar a atividade dos genótipos como baixa (c.-903TG), intermédia (c.-903TT/c.-741AG e c.-903TT/c.-741AA), ou alta (c.-903TT/c.-741GG). (58) Foi igualmente detetada uma relação entre o genótipo c.-903TT e o aumento do risco de desenvolvimento de cancro do pulmão. (57,59)

Introdução

Adicionalmente, Nikolic e colaboradores observaram que doentes com bronquiectasia, que possuíam genótipos correspondentes a maior atividade transcricional, apresentavam uma resposta mais eficiente à terapia utilizada no tratamento desta patologia pulmonar, quando comparados com os doentes que possuíam genótipos correspondentes a uma atividade intermédia/baixa. (57) Estes resultados sugerem que a elastase é um interveniente do processo inflamatório que conduz à lesão do tecido pulmonar, devido à sua importância no equilíbrio proteolítico dos tecidos alvo.

II. Objetivos

II. Objetivos

Os doentes renais crónicos hemodialisados apresentam um estado inflamatório permanente decorrente da própria patologia e de diferentes fatores associados ao procedimento de hemodiálise. Este é acompanhado pela ativação de neutrófilos, que está associada a ativação metabólica das células, com produção de espécies reativas de oxigénio e desgranulação. Um dos constituintes das granulações primárias dos neutrófilos é a elastase, cuja atividade parece ser influenciada por variações genéticas, que podem contribuir para exacerbar e perpetuar a resposta inflamatória. A inflamação constitui, como se referiu, um fator de risco cardiovascular e pode também contribuir para o agravamento da anemia dos doentes renais, alterando o metabolismo do ferro. Assim, o presente trabalho tem como principais objetivos:

(i) determinar a presença dos polimorfismos da região promotora do gene *ELANE* num grupo de doentes renais crónicos portugueses;

(ii) estudar a influência dos polimorfismos identificados nos níveis plasmáticos de elastase neutrofílica;

(iii) avaliar o impacto dos polimorfismos identificados no processo inflamatório e no *stress* oxidativo associados à DRC terminal, na adequação da diálise, no metabolismo do ferro, no estado nutricional do doente e no prognóstico desta patologia.

III. Materiais e métodos

III. Materiais e métodos

Com vista a cumprir os objetivos propostos, o presente trabalho foi orientado de acordo com o fluxograma representado na Figura 10.

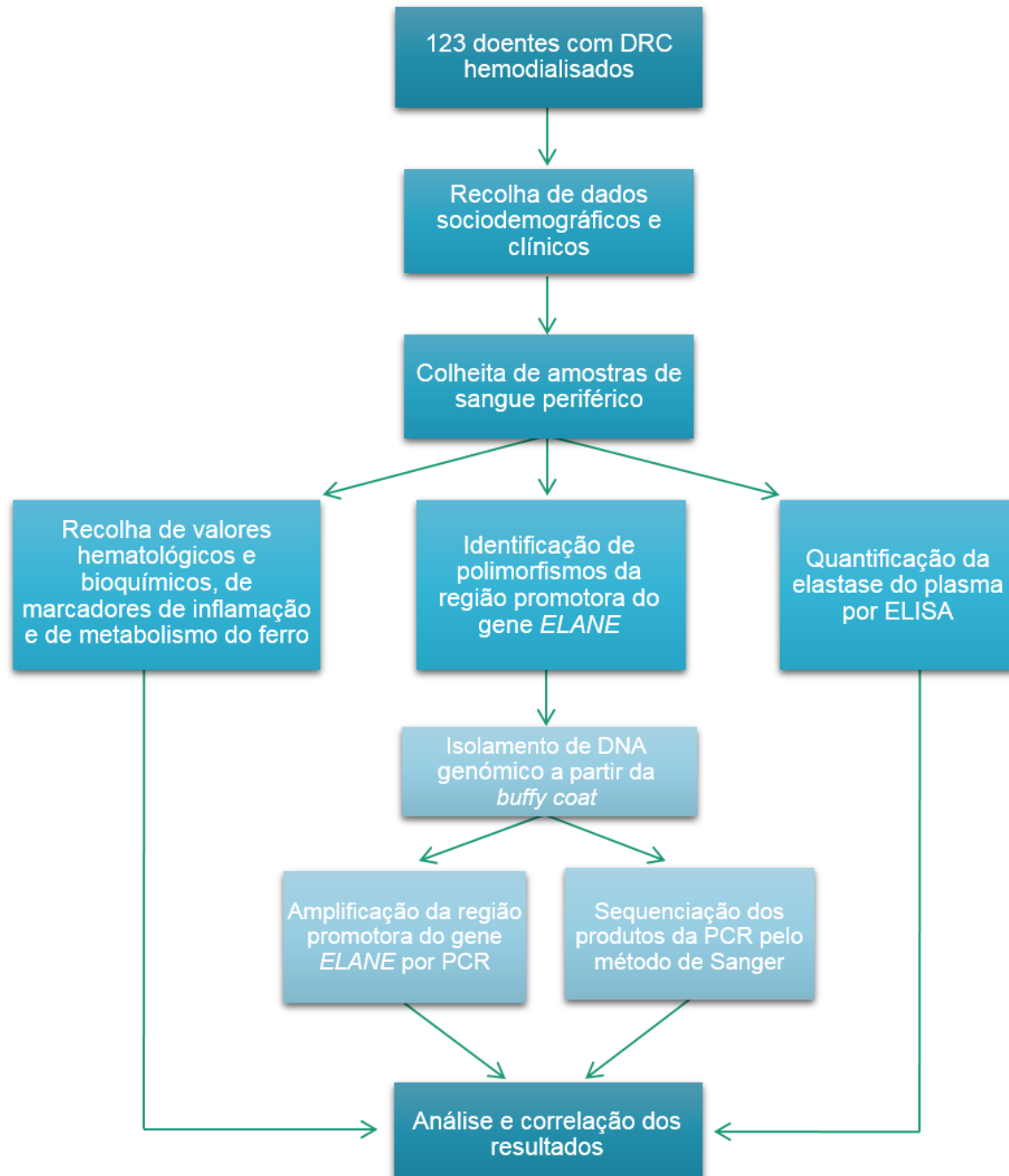


Figura 10 - Fluxograma do trabalho experimental.

Neste trabalho fez-se o isolamento do DNA, a identificação de polimorfismos e a quantificação da elastase. Os valores hematológicos, parâmetros bioquímicos, marcadores de inflamação e do metabolismo do ferro, previamente determinados, foram recolhidos a partir dos registos dos doentes, e usados para avaliar a correlação com os polimorfismos identificados e com as concentrações de elastase aferidas.

1. População em estudo

Este estudo transversal incluiu 123 doentes portugueses com DRC terminal sob hemodiálise (69 homens e 54 mulheres, média \pm desvio padrão das idades: 65,3 \pm 13,9 anos). Os doentes realizaram hemodiálise regular três vezes por semana, cada sessão durando cerca de 3-5 horas, por um período mediano de 2.5 (1.2-5.2) anos. No procedimento hemodialítico foram utilizados dialisadores de polissulfona de alto fluxo da classe-FX (*Fresenius, Bad Homburg, Alemanha*). Foram recolhidas informações sociodemográficas e clínicas. As etiologias subjacentes à DRC incluíram nefropatia diabética (n=66), nefroesclerose hipertensiva (n=21) e outras causas (n=36), tendo-se excluído os doentes portadores de doenças autoimunes, malignidades e infeções agudas ou crónicas.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética local e todos os participantes deram o seu consentimento informado por escrito.

2. Recolha de amostras de sangue e avaliação laboratorial

Foram colhidas amostras de sangue periférico, imediatamente antes da segunda sessão de diálise semanal, para tubos com anticoagulante (ácido etilenodiaminotetracético, EDTA) para obtenção de plasma e *buffy coat*, por centrifugação a 1600g durante 15 min à temperatura ambiente. As amostras foram aliquotadas e conservadas a -80°C.

Os valores hematológicos e bioquímicos recolhidos foram determinados usando as seguintes metodologias: os hemogramas foram obtidos num contador automático de células sanguíneas (*Sysmex K1000; Sysmex, Alemanha*) e as

contagens diferenciais de leucócitos e de reticulócitos, efetuadas por microscopia; os parâmetros bioquímicos foram avaliados com *kits* comerciais, seguindo as recomendações dos fabricantes: a concentração sérica de ferro foi determinada por espectrofotometria (*Iron, Randox Laboratories Ltd.*, Irlanda do Norte, Reino Unido); as concentrações séricas de ferritina e de transferrina por imunoturbidimetria (*Ferritin, Randox Laboratories Ltd.*; *Transferrin, Randox Laboratories Ltd.*); as concentrações do recetor solúvel de transferrina (*Human sTfR immunoassay, R&D Systems*, Minneapolis, E.U.A.) e de IL-6 sérica (*Human IL-6 High Sensitivity ELISA, eBioscience*, Áustria) foram avaliadas por ensaios imunoenzimáticos de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*); os níveis plasmáticos de hepcidina-25 foram quantificados usando um imunoensaio enzimático (*Bachem Group, Peninsula Laboratories, LLC*, Califórnia); a saturação de transferrina foi calculada pela fórmula: $ST(\%) = 70,9 \times [\text{ferro}]_{\text{soro}}(\text{mg/dL}) / [\text{transferrina}]_{\text{soro}}(\text{mg/dL})$; a concentração sérica de proteína C-reativa foi determinada por nefelometria [*CRP (latex) High-sensitivity, Roche Diagnostics*].

3. Identificação dos polimorfismos da região promotora do gene *ELANE*

3.1. Extração de DNA genómico a partir da *buffy coat*

O DNA genómico de todos os doentes foi extraído a partir da *buffy coat* utilizando o método de proteinase K/precipitação com sal: misturaram-se 200µL de amostra com 1000µL de tampão de lise (0,32M solução de sacarose, 10mM Tris-HCl pH=7,5, 5mM MgCl₂.6H₂O, 1% Triton-X100); após 1 min em gelo, centrifugou-se a 14000g por 3 min e descartou-se o sobrenadante; o sedimento foi lavado 3 vezes com água esterilizada e centrifugado a 14000g por 3 min; após as lavagens, o sedimento foi ressuspendido em 220µL de água estéril, 80µL de tampão de proteinase K [0,375M NaCl, 0,12M EDTA.2H₂O, pH=8,0, 40µL de 10% SDS e 30µL de proteinase K (*Bioron*, Ludwigshafen, Alemanha)], e incubado a 55°C durante 45 min; adicionaram-se 150µL de solução 4M de NaCl, agitou-se e deixou-se repousar em gelo durante 5 min; centrifugou-se a 14000g durante 10 min, recolhendo-se depois o sobrenadante para um tubo contendo 900µL de etanol absoluto e incubou-se a -20°C durante 15 min; após centrifugação a 14000g durante 10 min, descartou-

se o sobrenadante, adicionaram-se 900µL de etanol 70% e colocou-se a -20°C durante 15 min; depois de uma centrifugação a 14000g por 10 min, removeu-se o sobrenadante, e repetiu-se este procedimento mais 3 vezes. Após evaporação total do etanol ressuspendeu-se o sedimento de DNA em tampão TE (10mM Tris-HCl pH=7,5, 1mM EDTA.2H₂O pH 8,0) e armazenou-se a 4°C ou a -20°C, de acordo com a utilização posterior. A concentração e a qualidade do DNA extraído foram determinadas a partir dos valores de absorvência (Abs) a 260nm e da razão Abs₂₆₀/Abs₂₈₀, respetivamente, no espectrofotómetro *NanoDrop*[®] 1000, da *Thermo Scientific*[™].

3.2. Amplificação da região promotora do gene *ELANE*

Para cada doente foi feita a amplificação da região promotora do gene *ELANE*, por PCR convencional, utilizando um termociclador *T100*[™] da *Bio-Rad*[®] e tendo por base condições experimentais previamente descritas, (59) após otimização e adaptação das mesmas.

A região promotora foi amplificada usando os *primers forward* 5'-GGAAGG ACCAGAGAAGTGC-3' e *reverse* 5'-CTGCCAAACCTAGACCTGAG-3', que constituem um fragmento com 397 pb. A PCR foi realizada num volume final de 25µL contendo aproximadamente 3ng de DNA genómico, 10pmol de cada *primer* e 12,5µL de *Master Mix Dream Taq Green*[™], *Thermo Scientific*[™] [tampão *Dream Taq Green*[™], *Dream Taq*[™] DNA polimerase, 0,2mM de cada dNTP (desoxirribonucleótido trifosfatado), 2mM MgCl₂]. As reações de amplificação foram efetuadas de acordo com as condições apresentadas na Tabela 3. Por cada conjunto de reações de PCR foi realizado um controlo negativo, adicionando 1µL de água destilada à reação de PCR em substituição do DNA genómico.

A análise dos produtos da PCR (10µL) foi feita por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), contendo 1µL de brometo de etídio, para posterior visualização das bandas de DNA no gel, e na presença do padrão de peso molecular [*NZYDNA Ladder V*, da *Nzytech*[®] (100-1000 pb)]. A eletroforese foi realizada a 95 Volts, durante cerca 45 min e o gel foi observado e fotografado num transiluminador *Vilber Lourmat*[®].

Tabela 3 - Condições utilizadas na PCR convencional para amplificação da região promotora do gene *ELANE*.

Passo da reação	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	2 min	1
Desnaturação	95°C	30 s	35
<i>Annealing</i>	65°C	30 s	
Extensão	72°C	40 s	
Extensão final	72°C	10 min	1

Todo o material utilizado na preparação das reações foi previamente autoclavado e descontaminado com luz UV em câmara de PCR.

3.3. Sequenciação dos produtos de PCR

Uma vez confirmada a amplificação da região promotora do gene *ELANE* para cada doente, os produtos da PCR (15µL) foram enviados para a empresa *GATC Biotech*[®], respeitando as recomendações do serviço *SUPREMERun*[®]. Por cada 3 amostras foram preparados, também, tubos com 20µL de *primer forward* (10pmol). As amostras foram marcadas com os códigos de barras apropriados e enviadas para as instalações da *GATC*, onde foi feita a purificação dos produtos de PCR, para remoção do excesso de *primers*, DNA polimerase e dNTP's, e a posterior sequenciação pelo método de *Sanger* automatizado, num sequenciador *ABI PRISM*[®] 3100 Genetic Analyzer[®] (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, E.U.A.).

3.4. Análise das sequenciações

Os eletroferogramas obtidos pela *GATC Biotech*[®] foram analisados no software *Chromas lite 2.1.1*[™] (*Technelysium*, Austrália), e as sequências correspondentes foram comparadas com uma sequência de referência para o gene *ELANE* (código de referência no *GenBank*: NG_009627.1), para deteção da presença de polimorfismos.

4. Quantificação da elastase plasmática

Para cada doente fez-se a quantificação da elastase neutrofílica presente no plasma, utilizando as recomendações do *kit* comercial de ELISA (*Human PMN elastase platinum ELISA*, *eBioscience*, Áustria). Resumidamente: as amostras de plasma foram diluídas 1:100 com tampão de diluição, e foram preparados os controlos (de concentrações 0,5-1,5ng/mL e 5-15ng/mL) e os padrões de elastase fornecidos no *kit*. Em placa de ELISA de 96 poços dispensaram-se 100µL dos padrões e dos brancos, em duplicado, os controlos e as amostras diluídas; a placa foi incubada à temperatura ambiente durante 1 hora, com agitação; descartou-se o conteúdo dos poços e procedeu-se à lavagem dos mesmos com a adição de 400µL de tampão de lavagem, por 4 vezes; adicionaram-se 150µL de conjugado-HRP (*HorseRadish Peroxidase*) a cada poço e incubou-se novamente durante 1 hora; descartou-se o conteúdo dos poços, fizeram-se 4 lavagens e adicionou-se 200µL da solução de substrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina); incubou-se a placa à temperatura ambiente, até os padrões mais concentrados adquirirem uma cor azul escura, adicionando-se, então, 50µL de solução *stop* a todos os poços, para parar a reação; leu-se a absorvência a 450 nm no espectrofotómetro de microplacas *PowerWave XS*, da *Bio-Tek*®. Com base nos valores de absorvência e das concentrações dos padrões de elastase, traçou-se a curva de calibração e determinou-se a concentração de elastase das amostras e dos controlos. Os controlos fornecidos pelo fabricante permitiram validar os ensaios realizados.

5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS®) versão 21.0 para *Windows*® (SPSS Inc., Armonk, NY, E.U.A.). A distribuição das variáveis contínuas foi analisada usando o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os valores das variáveis com distribuição normal são apresentados como média \pm desvio padrão, e os que não apresentam distribuição normal são apresentados como mediana (intervalo interquartil). De acordo com o tipo de distribuição, paramétrica ou não paramétrica, as diferenças entre grupos foram

analisadas através do teste *t-Student* ou do teste *Mann-Whitney*, respetivamente. As comparações de múltiplas variáveis entre grupos foi realizada através do algoritmo *one-way ANOVA* com o teste *Post Hoc* de *Tukey*. A associação entre variáveis categóricas foi analisada através do teste do X^2 ou do teste exato de *Fischer*. As diferenças entre grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

IV. Resultados

IV. Resultados

1. Identificação dos polimorfismos da região promotora do gene *ELANE*

Para cada doente foi feita a amplificação da região promotora do gene *ELANE*, por PCR convencional, e a confirmação posterior dos produtos obtidos por eletroforese em gel de agarose. De acordo com a base de dados *GenBank*, o produto de PCR obtido a partir dos *primers* usados, consiste num fragmento de DNA com 397 pb. Os resultados obtidos mostram a presença de uma banda com peso molecular aproximado de 400 pb (Figura 11), que compreende a região promotora do gene *ELANE*. Este padrão de uma banda foi observado em 117 doentes. Por vezes, foi detetada uma segunda banda ténue com peso molecular inferior a 100 pb, que corresponde à formação de *primer dimer* (Figura 11).

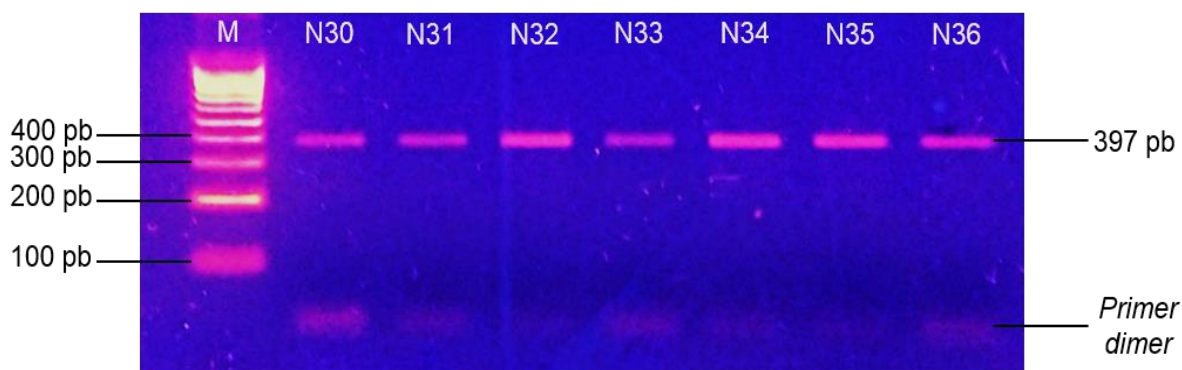


Figura 11 - Eletroforese dos produtos de PCR obtidos, correspondentes à região promotora do gene *ELANE*, em gel de agarose 2%. As bandas apresentadas correspondem a amostras dos doentes N30, N31, N32, N33, N34, N35 e N36; M: padrão de peso molecular.

Verificou-se, em alguns doentes, a presença de duas bandas (Figura 12). Alguns apresentavam uma banda de 397 pb e outra com peso molecular de 449 pb (amostra N58), enquanto outros mostravam uma banda de 397 pb e outra de 502 pb (amostra N68).

Resultados

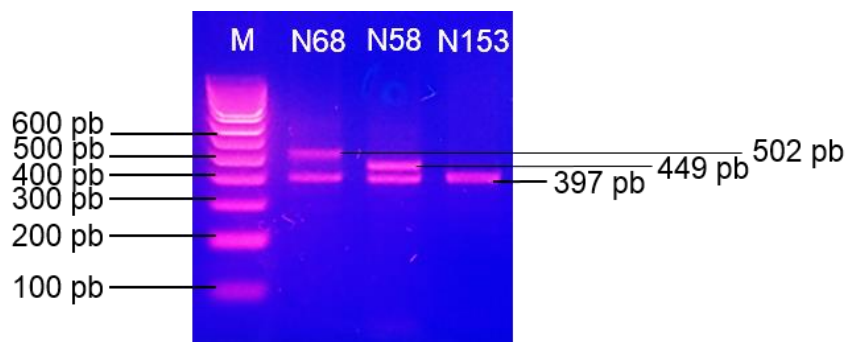


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de doentes apresentando duas bandas, e comparação com o produto de PCR de um doente com uma banda. O doente N58 exibe duas bandas com pesos moleculares de 397 pb e 449 pb; o doente N68 apresenta duas bandas com pesos moleculares de 397 pb e 502 pb; o doente N153 possui uma banda de 397 pb; M: padrão de peso molecular.

Uma vez confirmada a amplificação da região promotora do gene *ELANE*, os produtos de PCR foram purificados e posteriormente sequenciados pelo método de Sanger automatizado. Os eletroferogramas e as respectivas sequências foram comparados com a sequência de referência do gene *ELANE* para identificação de polimorfismos previamente descritos na literatura, ou de novos polimorfismos. Dos quatro polimorfismos de um único nucleótido (SNPs) já descritos, foram detetados apenas dois: c.-903T>G (Figura 13-A) e c.-741G>A (Figura 13-B). Adicionalmente, encontrou-se um novo SNP: c.-801G>A (Figura 13-C). Para o polimorfismo c.-741G>A foram observados casos de heterozigotia e homozigotia (Figura 13-A.II e A.III, respetivamente). Para os polimorfismos c.-903T>G e c.-801G>A, apenas se identificaram casos de heterozigotia (Figura 13-B.II e C.II, respetivamente).

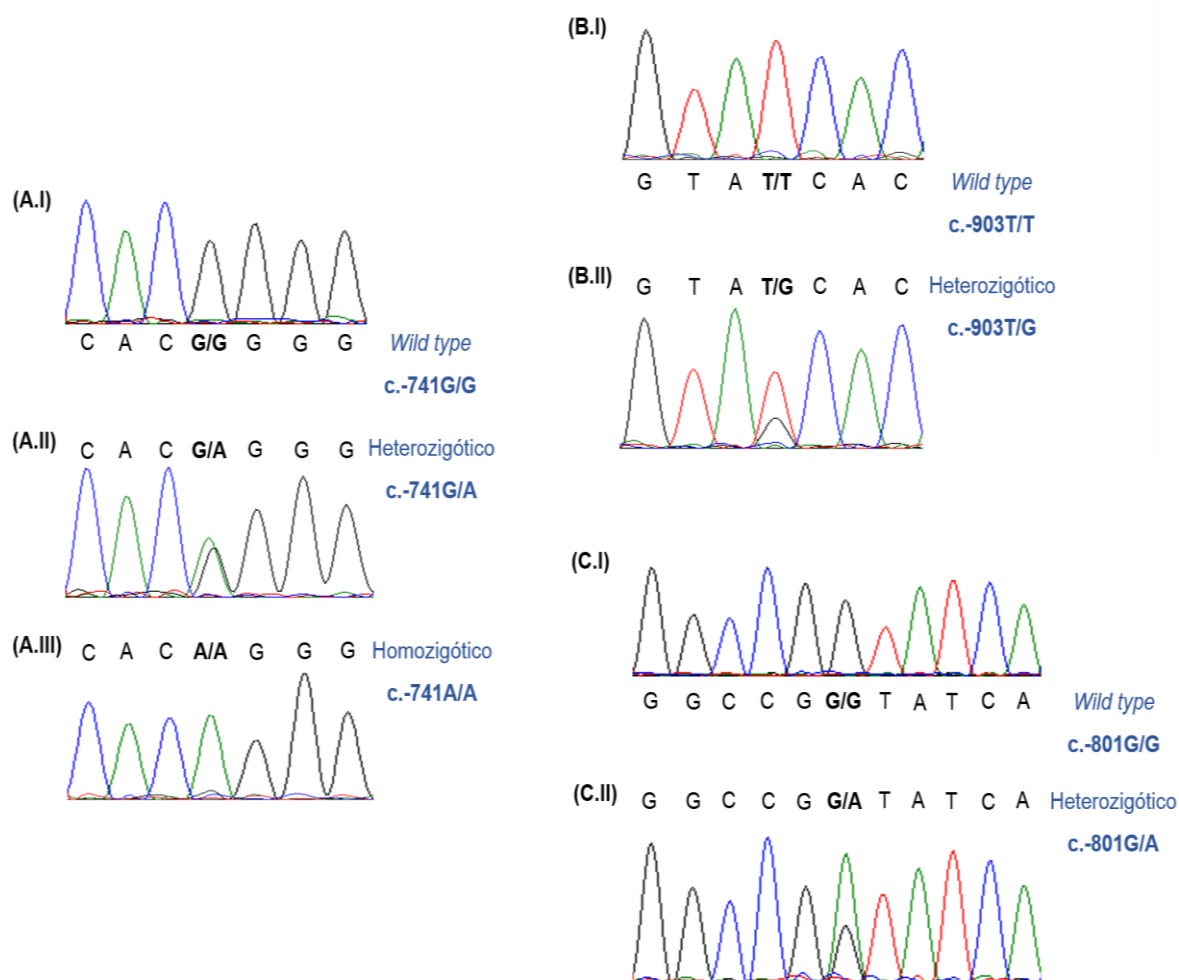


Figura 13 - Eletroferogramas representativos dos SNPs identificados nos doentes renais crônicos em estudo. Gene wild type (A.I), heterozigotia (A.II) e homozigotia (A.III) para o polimorfismo c.-741G>A. Gene wild type (B.I) e heterozigotia (B.II) para o polimorfismo c.-903T>G. Gene wild type (C.I) e heterozigotia (C.II) para o polimorfismo c.-801G>A.

As sequenciações efetuadas evidenciaram, ainda, a presença de duplicações na região promotora do gene *ELANE* (Anexos - Figuras 17 e 18), correspondentes às amostras dos doentes que apresentavam duas bandas como produtos de PCR (Figura 14).

Verificou-se que os doentes N58, N145, N151 e N159 apresentavam, em heterozigotia, uma sequência extra de 52 pb localizada entre a 4ª e a 5ª repetição que compõem o promotor do gene *ELANE* (Figura 15), o que explica a presença de uma banda adicional com o peso molecular de 449 pb. Nos doentes N68 e N144

Resultados

determinou-se a presença de um bloco extra, em heterozigotia, composto pela 4ª e pela 5ª repetição da região promotora, inserido entre a 5ª e a 6ª repetição (Figura 16), correspondente à banda com um peso molecular de 502 pb.

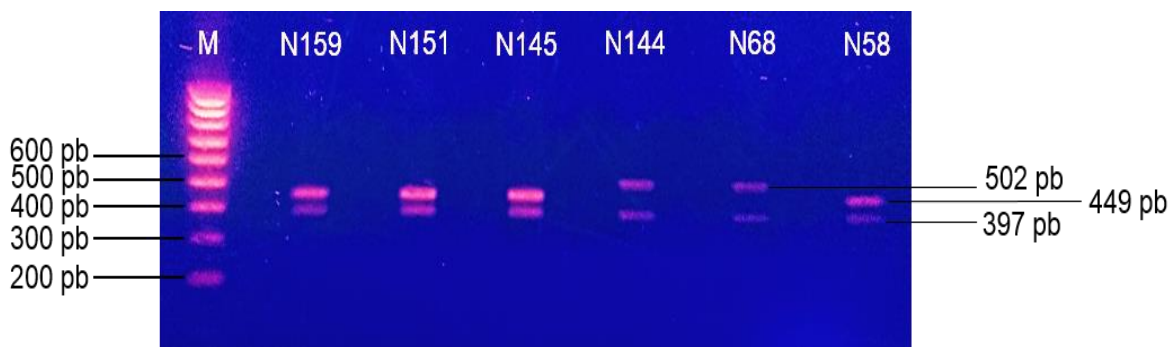


Figura 14 - Eletroforese dos produtos de PCR dos doentes que apresentavam duas bandas correspondentes a duplicações na região promotora do gene *ELANE*. Nos doentes N58, N145, N151 e N159 foram detetadas duas bandas, uma com 397 pb e outra com 449 pb; nos doentes N68 e N144 detetou-se uma banda de 397 pb e outra de 502 pb. M: marcador de peso molecular.

```

5' - CC | CGACACAGCTGCATGTGGCCGGTATCACAGGGCCCTGG
      GTAAACTGAGGCAGG | CGACACAGCTGCATGTGGCCGGTATCA
      CAGGGCCCTGGGTAAACTGAGGCAGG | CGACACAGCTGCATGT
      GGCCGGTATCACAGGGCCCTGGGTAAACTGAGGCAGG | CGACA
      CAGCTGCATGTGGCCGTATCACAGGGCCCTGGGTAAACTGAGG
      CAGG | TGACACAGCTGCATGTGGCCGGTATCACGGGGCCCTG
      GGTAAACTGAGGCAGG | TGACACAGCTGCATGTGGCCGGTATC
      ACGGGGCCCTGGATAAACAGAGGCAGG | CGACACAGCTGCATG
      TGGCCGGTATCACGGGGCCCTGGGTAAACTGAGGCAGG | CG - 3'
  
```

Figura 15 - Sequência da região promotora do gene *ELANE* e a sequência extra de 52 pb. As barras vermelhas delimitam as seis repetições que compõem a região promotora. A sequência extra de 52 pb (a vermelho) encontra-se inserida entre a 4ª (a azul) e a 5ª (a verde) repetição.


```

5' - CC | CGACACAGCTGCATGTGGCCGGTATCACAGGGCCC
TGGGTAAACTGAGGCAGG | CGACACAGCTGCATGTGGCCG
GTATCACAGGGGCCCTGGGTAAACTGAGGCAGG | CGACACAG
CTGCATGTGGCCGGTATCACAGGGGCCCTGGGTAAACTGAG
GCAGG | CGACACAGCTGCATGTGGCCGGTATCACAGGGCCC
TGGGTAAACTGAGGCAGG | TGACACAGCTGCATGTGGCCG
GTATCACGGGGGCCCTGGATAAACAGAGGCAGG | CGACACA
GCTGCATGTGGCCGTATCACAGGGGCCCTGGGTAAACTGA
GGCAGG | TGACACAGCTGCATGTGGCCGGTATCACGGGG
CCCTGGATAAACAGAGGCAGG | CGACACAGCTGCATGTGG
CCGGTATCACGGGGGCCCTGGGTAAACTGAGGCAGG | CG - 3'

```

Figura 16 - Sequência da região promotora do gene *ELANE* e a sequência do bloco extra. As barras vermelhas delimitam as seis repetições que compõem a região promotora. O bloco extra composto pela 4ª e pela 5ª repetição (a vermelho) encontra-se inserido entre a 5ª (a verde) e a 6ª (a laranja) repetição.

1.1. Prevalências e frequências alélicas dos polimorfismos identificados

Após a análise de todos os eletroferogramas, determinaram-se as prevalências e as frequências alélicas dos polimorfismos identificados na população em estudo (Tabela 4). Para o polimorfismo c.-903T>G, a prevalência de TT e TG foi de 90,2% (111/123) e 9,8% (12/123), respetivamente. As frequências alélicas encontradas foram de 95,1% para o alelo *wild type* (T) e de 4,9% para o alelo polimórfico (G). Relativamente ao polimorfismo c.-741G>A registou-se uma prevalência de 68,3% (84/123), 29,3% (36/123) e 2,4% (3/123) para os genótipos GG, GA e AA, respetivamente, tendo o alelo *wild type* (G) uma frequência alélica de 82,9% e o alelo polimórfico (A) uma frequência alélica de 17,1%. Para o polimorfismo c.-801G>A, a prevalência de GG e GA foi de 99,2% (122/123) e 0,8% (1/123), respetivamente. As frequências alélicas encontradas foram de 99,6% para o alelo *wild type* (G) e de 0,4% para o alelo polimórfico (A). No que diz respeito à

Resultados

sequência de 52 pb e ao bloco extra de repetições, a prevalência de heterozigotia na população em estudo foi de 3,3% (4/123) e 1,6% (2/123), respectivamente, apresentando uma frequência alélica de 1,6% e 0,8%, respectivamente. É de referir que dois dos 123 doentes apresentavam, simultaneamente, heterozigotia para os polimorfismos c.-903T>G e c.-741G>A.

Tabela 4 - Prevalência e frequências alélicas para cada polimorfismo identificado na população doente renal crónica em estudo.

	Polimorfismo	Genótipo	Casos na população com DRC		Frequências alélicas	
			N	%	Alelo	%
Previamente descritos	c.-903T>G	TT	111	90.2	T	95.1
		TG	12	9.8	G	4.9
		GG	0	0.0		
	c.-741G>A	GG	84	68.3	G	82.9
		GA	36	29.3	A	17.1
		AA	3	2.4		
	Extra 52 pb	Wild type	119	96.7	Wild type	98.4
		Hetero	4	3.3	Extra 52 pb	1.6
		Homo	0	0.0		
Novos	c.-801G>A	GG	122	99.2	G	99.6
		GA	1	0.8	A	0.4
		AA	0	0.0		
	Bloco extra	Wild type	121	98.4	Wild type	99.2
		Hetero	2	1.6	Bloco extra	0.8
		Homo	0	0.0		

Os polimorfismos identificados em cada doente e os respetivos genótipos encontram-se apresentados na Tabela 7, em Anexos.

2. Relação dos polimorfismos c.-903T>G e c.-741G>A com os níveis plasmáticos de elastase e com outros parâmetros em análise

Foi avaliada a relação dos polimorfismos c.-903T>G e c.-741G>A, que registaram maior prevalência na população em estudo, com os níveis circulantes de elastase, dados clínicos, resultados hematológicos, índices de eficiência de

diálise recolhidos, e com marcadores de inflamação e do metabolismo do ferro e de nutrição. Relativamente aos níveis plasmáticos de elastase, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas para estes polimorfismos, embora os doentes homozigóticos para o polimorfismo c.-741G>A apresentem uma diminuição na concentração plasmática de elastase (Tabelas 5 e 6). No que diz respeito aos restantes parâmetros analisados, para o polimorfismo c.-903T>G, não se verificou qualquer diferença estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos (Tabela 5); já para o polimorfismo c.-741G>A, a análise revelou que os doentes homozigóticos apresentam valores aumentados na contagem de leucócitos e neutrófilos, na razão neutrófilos/linfócitos, e nos níveis plasmáticos de bilirrubina e de oxLDL, possuindo, ainda, valores diminuídos de albumina (Tabela 6).

Tabela 5 - Dados clínicos e sociodemográficos, eficiência de diálise, valores hematológicos e de marcadores de metabolismo do ferro, inflamatórios e nutricionais, para o genótipo do polimorfismo c.-903T>G.

	População Total (n=123)	c.-903T>G		Valor p
		TT (n=111)	TG (n=12)	
Dados clínicos e marcadores de eficiência da diálise				
Idade, anos	65.3 ± 13.9	65.2 ± 13.5	66.4 ± 17.2	0.776
Gênero, % de homens	56.1	54.1	75.0	0.165
Uso de CVC, n (%)	18 (14.6)	18 (16.2)	0 (0.0)	0.211
Uso de FAV, n (%)	105 (85.4)	93 (83.8)	12 (100)	
Doentes diabéticos, n (%)	45 (36.6)	39 (35.1)	6 (50.0)	0.353
Tempo prévio em diálise, meses	2.5 (1.2-5.2)	2.7 (1.2-5.3)	2.2 (1.1-5.1)	0.780
URR, %	75.9 ± 6.3	75.9 ± 6.0	76.8 ± 8.4	0.627
Kt/V	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.2	0.824
Creatinina, mg/dL	8.3 ± 2.9	8.3 ± 2.9	8.7 ± 2.9	0.619
Darbopoeitina, µg/kg/semana	0.4 (0.2-0.7)	0.4 (0.2-0.8)	0.6 (0.2-0.7)	0.680
Dados hematológicos				
Hemoglobina, g/dL	11.8 ± 1.2	11.8 ± 1.4	11.9 ± 1.4	0.824
Hematócrito, %	36.8 ± 4.5	36.8 ± 4.5	36.5 ± 4.6	0.808
Eritrócitos, x10 ¹² /L	3.8 ± 0.5	3.8 ± 0.5	3.8 ± 0.5	0.975
VGM, fL	95.8 ± 4.9	95.8 ± 5.0	95.0 ± 4.3	0.557
HGM, pg	30.8 ± 2.1	30.7 ± 2.1	31.4 ± 1.9	0.352
CHGM, g/dL	32.2 ± 1.2	32.1 ± 1.2	32.7 ± 1.1	0.148
RDW, %	15.1 ± 1.9	15.1 ± 2.0	14.9 ± 1.6	0.777
Reticulócitos, x10 ⁹ /L	50.5 ± 28.6	50.2 ± 27.1	53.9 ± 45.3	0.714
IPR	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.9	0.754
Leucócitos, x10 ⁹ /L	6.2 ± 1.8	6.2 ± 1.8	6.2 ± 1.8	0.965
Neutrófilos, x10 ⁹ /L	3.9 ± 1.4	3.8 ± 1.4	3.9 ± 1.2	0.921
Linfócitos, x10 ⁹ /L	1.6 ± 0.6	1.6 ± 0.6	1.6 ± 0.6	0.618
Razão Neutrófilos/linfócitos	2.6 ± 1.3	2.6 ± 1.3	2.8 ± 1.3	0.640
Bilirrubina, mmol/L	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.807
Marcadores de metabolismo do ferro				
Ferro, mg/dL	43.3 ± 25.6	42.2 ± 24.2	53.8 ± 35.4	0.134
Transferrina, mg/dL	177.6 ± 33.9	177.2 ± 34.2	181.7 ± 32.4	0.665
Saturação de transferrina, %	17.9 ± 11.4	17.3 ± 10.4	22.6 ± 18.7	0.134
Ferritina, ng/mL	400.2 ± 157.5	399.7 ± 151.7	404.9 ± 212.3	0.914
sTfR, nmol/L	23.9 ± 11.5	23.9 ± 11.3	24.8 ± 13.3	0.780
Hepcidina-25, ng/mL	1599.1 (800.3-2386.6)	1565.9 (804.6-2371.3)	2533.2 (254.2-3118.6)	0.403
Marcadores de inflamação				
CRP, mg/dL	4.8 (2.2-13.3)	4.9 (2.2-14.4)	3.7 (1.9-8.9)	0.509
IL-6, pg/mL	2.2 (1.3-4.0)	2.1 (1.3-3.9)	2.3 (1.6-5.0)	0.551
oxLDL, U/L	34.9 ± 11.0	34.9 ± 10.8	34.1 ± 13.1	0.805
Elastase, ng/mL	30.5 (21.2-40.8)	30.7 (21.2-41.1)	28.7 (19.3-38.9)	0.673
Marcadores nutricionais				
Albumina, g/dL	3.9 ± 0.4	3.9 ± 0.4	4.0 ± 0.3	0.313
BMI, Kg/m ²	25.9 ± 4.6	25.9 ± 4.7	26.0 ± 3.5	0.947

Kt/V: coeficiente de *clearance* de ureia na diálise por tempo de diálise/volume de distribuição de ureia; URR: razão de redução de ureia; VGM: volume globular médio; HGM: hemoglobina globular média; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; RDW: coeficiente de distribuição de glóbulos vermelhos (*red cell distribution width*); IPR: índice de produção de reticulócitos; sTfR: recetor solúvel de transferrina; CRP: proteína C-reativa; IL-6: interleucina-6; oxLDL: LDL oxidadas; BMI: índice de massa corporal (*body mass index*).

Tabela 6 - Dados clínicos e sociodemográficos, eficiência de diálise, valores hematológicos e de marcadores de metabolismo do ferro, inflamatórios e nutricionais, para o genótipo do polimorfismo c.-741G>A.

	População Total (n=123)	c.-741G>A			Valor p
		GG (n=84)	GA (n=36)	AA (n=3)	
Dados clínicos e marcadores de eficiência da diálise					
Idade, anos	65.3 ± 13.9	66.6 ± 13.4	61.9 ± 15.0	68.4 ± 3.6	0.226
Gênero, % de homens	56.1	52.4	63.9	66.7	0.474
Uso de CVC, n (%)	18 (14.6)	12 (14.3)	6 (16.7)	0 (0.0)	0.726
Uso de FAV, n (%)	105 (85.4)	72 (85.7)	30 (83.3)	3 (100)	
Doentes diabéticos, n (%)	45 (36.6)	33 (39.3)	10 (27.8)	2 (66.7)	0.267
Tempo prévio em diálise, meses	2.5 (1.2-5.2)	2.7 (1.2-5.2)	2.5 (1.3-7.4)	2.4 (2.0-X)	0.386
URR, %	75.9 ± 6.3	76.3 ± 6.0	74.9 ± 6.9	77.8 ± 4.7	0.448
Kt/V	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.4	1.4 ± 0.2	1.7 ± 0.1	0.351
Creatinina, mg/dL	8.3 ± 2.9	8.2 ± 2.9	8.7 ± 2.9	6.7 ± 3.1	0.396
Darbopoeitina, µg/kg/semana	0.4 (0.2-0.7)	0.4 (0.2-0.7)	0.5 (0.2-0.7)	0.4 (0.4-X)	0.848
Dados hematológicos					
Hemoglobina, g/dL	11.8 ± 1.2	11.7 ± 1.4	12.2 ± 1.2	11.5 ± 1.3	0.102
Hematócrito, %	36.8 ± 4.5	36.4 ± 4.6	38.0 ± 4.1	34.3 ± 4.3	0.131
Eritrócitos, x10 ¹² /L	3.8 ± 0.5	3.8 ± 0.5	3.9 ± 0.4	3.5 ± 0.4	0.199
VGM, fL	95.8 ± 4.9	95.4 ± 5.0	96.5 ± 4.7	98.5 ± 4.3	0.329
HGM, pg	30.8 ± 2.1	30.5 ± 2.1	31.3 ± 2.0	32.6 ± 1.1	0.118
CHGM, g/dL	32.2 ± 1.2	32.1 ± 1.1	32.3 ± 1.3	33.4 ± 0.5	0.162
RDW, %	15.1 ± 1.9	15.3 ± 2.0	14.6 ± 1.4	17.5 ± 5.6	0.096
Reticulócitos, x10 ⁹ /L	50.5 ± 28.6	52.4 ± 30.2	45.4 ± 25.5	57.8 ± 4.1	0.445
IPR	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.6	0.9 ± 0.6	1.1 ± 0.2	0.601
Leucócitos, x10 ⁹ /L	6.2 ± 1.8	6.2 ± 1.8	6.2 ± 1.6	8.8 ± 3.5	0.048
Neutrófilos, x10 ⁹ /L	3.9 ± 1.4	3.8 ± 1.3	3.6 ± 0.9	6.9 ± 3.7	<0.001
Linfócitos, x10 ⁹ /L	1.6 ± 0.6	1.6 ± 0.5	1.8 ± 0.7	1.3 ± 0.3	0.250
Razão Neutrófilos/linfócitos	2.6 ± 1.3	2.6 ± 1.2	2.3 ± 0.8	5.9 ± 4.5	<0.001
Bilirrubina, mmol/L	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	1.0 ± 1.3	<0.001
Marcadores de metabolismo do ferro					
Ferro, mg/dL	43.3 ± 25.6	42.6 ± 26.3	44.3 ± 25.2	50.0 ± 6.2	0.858
Transferrina, mg/dL	177.6 ± 33.9	177.1 ± 34.5	181.1 ± 30.0	150.0 ± 61.2	0.308
Saturação de transferrina, %	17.9 ± 11.4	17.5 ± 11.1	17.9 ± 11.7	28.3 ± 17.4	0.278
Ferritina, ng/mL	400.2 ± 157.5	406.1 ± 167.4	382.4 ± 135.6	448.1 ± 131.4	0.655
sTfR, nmol/L	23.9 ± 11.5	24.4 ± 12.1	23.1 ± 10.2	20.8 ± 7.4	0.754
Hepcidina-25, ng/mL	1599.1 (800.3-2386.6)	1662.1 (801.2-2411.4)	1541.7 (900.6-2393.6)	565.7 (537.8-X)	0.493
Marcadores de inflamação					
CRP, mg/dL	4.8 (2.2-13.3)	3.9 (2.1-12.8)	5.8 (2.7-15.5)	3.5 (1.9-X)	0.490
IL-6, pg/mL	2.2 (1.3-4.0)	2.1 (1.3-3.7)	2.1 (1.5-4.3)	3.5 (0.9-X)	0.519
oxLDL, U/L	34.9 ± 11.0	34.6 ± 9.5	33.9 ± 11.8	53.1 ± 25.5	0.013
Elastase, ng/mL	30.5 (21.2-40.8)	32.3 (23.7-40.2)	27.9 (18.3-44.1)	18.9 (17.2-X)	0.441
Marcadores nutricionais					
Albumina, g/dL	3.9 ± 0.4	3.9 ± 0.4	4.0 ± 0.3	3.5 ± 1.0	0.028
BMI, Kg/m ²	25.9 ± 4.6	25.9 ± 4.3	26.0 ± 5.2	26.3 ± 6.9	0.981

Kt/V: coeficiente de *clearance* de ureia na diálise por tempo de diálise/volume de distribuição de ureia; URR: razão de redução de ureia; VGM: volume globular médio; HGM: hemoglobina globular média; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; RDW: coeficiente de distribuição de glóbulos vermelhos (*red cell distribution width*); IPR: índice de produção de reticulócitos; sTfR: recetor solúvel de transferrina; CRP: proteína C-reativa; IL-6: interleucina-6; oxLDL: LDL oxidadas; BMI: índice de massa corporal (*body mass index*). X: amostra demasiado reduzida para cálculo do intervalo interquartil.

V. Discussão

V. Discussão

O primeiro objetivo deste trabalho incidiu na determinação da presença de polimorfismos na região promotora do gene *ELANE* numa população de doentes renais terminais. Até ao momento tinham sido identificados cinco polimorfismos nesta região: c.-903T>G, c.-832G>T, c.-789C>T, c.-741G>A e uma sequência extra de 52 pb, entre a 4ª e a 5ª repetição existentes na região promotora. (59) Destes cinco, apenas três foram identificados neste trabalho: c.-903T>G, c.-741G>A e os 52 pb extra. As frequências alélicas registadas para estes polimorfismos foram de 4,9% para o c.-903T>G, 17,1% para o c.-741G>A e 1,6% para a sequência extra. À exceção do alelo polimórfico (A) do polimorfismo c.-741G>A, os valores referidos são idênticos aos descritos por Park e colaboradores, que obtiveram frequências de 6%, 27% e 1%, respetivamente, num estudo envolvendo doentes oncológicos. (59) A diferença observada pode ser devida às populações analisadas, dado que uma é portuguesa e a outra americana. De facto, num outro estudo que envolveu a população americana, foram registadas frequências alélicas muito semelhantes às descritas por Park e colaboradores, com valores de 7% para o polimorfismo c.-903T>G, 26% para o c.-741G>A e 2% para a sequência extra. (58) Este resultado sugere que o polimorfismo c.-741G>A é menos frequente na população portuguesa.

Para além dos três polimorfismos referidos, neste estudo foram identificados dois novos polimorfismos: o SNP c.-801G>A e a presença de um bloco extra, composto pela 4ª e pela 5ª repetição constituintes da região promotora do gene *ELANE*, entre a 5ª e a 6ª repetição. As frequências alélicas para estes polimorfismos na população em estudo foram de 0,4% para o c.-801G>A e 0,8% para o bloco extra. Dada a baixa prevalência destes polimorfismos, e em conformidade com o que se observou para a sequência extra de 52 pb, cuja prevalência na população do nosso estudo foi de 3,3%, a análise da correlação entre estes polimorfismos e os diferentes parâmetros clínicos e laboratoriais não foi efetuada.

O segundo objetivo deste trabalho visou a avaliação da potencial influência dos polimorfismos identificados nos níveis circulantes de elastase. Esta protease é

produzida e armazenada nos grânulos primários das células precursoras granulocíticas da medula óssea, estando, portanto, presente em todos os granulócitos. A ativação dos neutrófilos por mediadores inflamatórios, ou a sua destruição, determina a libertação da elastase dos grânulos primários. (28,57,64,65). Assim, a quantidade de elastase que é libertada durante a desgranulação, depende do seu conteúdo por neutrófilo e do número de células circulantes.

A expressão do gene da elastase neutrofílica é regulada ao nível da transcrição (58,64,65) nas células precursoras mieloides da medula óssea, durante o estadio de promielócitos. Foi demonstrado que os polimorfismos c.-903T>G e c.-741G>A demarcavam diferentes atividades de transcrição no promotor do gene *ELANE*, sugerindo que estas variações genéticas influenciam a expressão de elastase. Foi observado que os genótipos c.-903TT/c.-741GG (*wild type*) determinavam níveis de transcrição mais elevados, quando comparados com os genótipos intermédios, c.-903TT/c.-741GA e c.-903TT/c.-741AA, e mais baixos para o genótipo c.-903TG. (58) De facto, os genótipos conducentes a uma maior atividade transcricional foram associados a um risco aumentado de desenvolvimento de cancro do pulmão, dado que a expressão de maior quantidade de elastase por neutrófilo pode levar à lesão dos tecidos pulmonares e favorecer o processo carcinogénico. (58,59) Existem referências na literatura que demonstram que a presença de SNPs na região promotora de determinados genes pode afetar a sua expressão, e influenciar a suscetibilidade para o desenvolvimento de certas patologias. (66–68) Por exemplo, a presença de um polimorfismo na região promotora do gene do recetor de vitamina D determina a presença de uma caixa GATA correspondente a um local de ligação do fator de transcrição GATA-1, que reduz a expressão deste recetor e diminui o risco de desenvolvimento de adenocarcinoma esofágico. (66) No promotor do gene *ELANE*, o genótipo T do polimorfismo c.-903T>G corresponde ao terceiro nucleótido de uma caixa GATA invertida (-TATC-), que estando ausente no genótipo G, pode interferir com a ligação de fatores de transcrição e diminuir a sua atividade. (58) Da mesma forma, o polimorfismo c.-741G>A, que está localizado 3 pb da extremidade-3' de uma caixa GATA invertida, pode afetar a estabilidade de ligação de determinados fatores de

transcrição e alterar a expressão do gene *ELANE*. Adicionalmente, a sequência de 53 pb, que se repete nesta região promotora, apresenta uma E-box, local de ligação de proteínas ativadoras, que pode, também, ser afetado pelos polimorfismos referidos, alterando a taxa de transcrição. (28,58) No entanto, e contrariamente ao que seria de esperar, a análise dos valores plasmáticos de elastase de acordo com os genótipos dos polimorfismos c.-903T>G e c.-741G>A não mostrou existirem diferenças estatisticamente significativas ($p=0,673$ e $p=0,441$, respetivamente), sugerindo que estes polimorfismos não influenciam os níveis circulantes de elastase. Não obstante, e tendo em conta que os diferentes genótipos apresentavam valores semelhantes na contagem de neutrófilos, as ligeiras variações que se observaram nas concentrações de elastase parecem sustentar as diferentes atividades descritas para estes genótipos. (58) A única exceção prende-se com o genótipo AA do polimorfismo c.-741G>A, que apresentando valores significativamente aumentados ($p<0,001$) na contagem de neutrófilos, parece estar associado a concentrações plasmáticas de elastase inferiores às do genótipo GA, quando seria de esperar um comportamento idêntico em termos de atividade transcricional. Estas discrepâncias podem ser atribuídas ao número reduzido de doentes ($n=3$) com homozigotia para este polimorfismo, sendo mesmo um fator limitante na análise dos resultados obtidos, impedindo a formulação de conclusões fundamentadas.

A baixa variabilidade observada nos níveis de elastase plasmática para os diferentes genótipos em análise não invalida a possibilidade de os polimorfismos identificados na região promotora do gene *ELANE* influenciarem a expressão desta protease. A elastase que é libertada após desgranulação dos neutrófilos, em condições normais, é completamente inativada pela $\alpha 1$ -antitripsina ($\alpha 1$ -AP), uma glicoproteína produzida no fígado, que é responsável pela inibição de várias proteases, garantindo a proteção dos tecidos circundantes da lesão enzimática. (58,59,69,70) A quantificação da elastase efetuada neste trabalho reflete a quantidade de protease circulante que foi inibida por esta anti-protease, visto que o *kit* de ELISA que foi utilizado é específico para o complexo formado entre ambas. No entanto, existem diferentes fatores que podem influenciar a quantidade plasmática de $\alpha 1$ -AP e a sua ação inibitória, bem como a porção de elastase

disponível para complexação, condicionando os valores obtidos por esta técnica experimental. De facto, foi demonstrado que cerca de 12% da elastase presente nos grânulos dos neutrófilos é mobilizada para a membrana destas células onde permanece cataliticamente ativa e resistente a inibidores. (70–72) Esta resistência verifica-se quando os neutrófilos aderem às paredes do endotélio ou a outros tecidos, definindo uma zona de acessibilidade restrita a inibidores, sendo esta particularidade a responsável pela eficiente ação catalítica da elastase. (71) Além disso, a quantidade de elastase disponível para complexação com a α 1-AP pode ainda ser condicionada por outras moléculas ou compostos, uma vez que existem outras proteínas, como a α 2-macroglobulina, (72) e fármacos, como é o caso dos antibióticos macrólidos, (57) com ação inibitória sobre esta protease. Por outro lado, existem variações genéticas que podem influenciar os níveis de α 1-AP no plasma. Yang e colaboradores demonstraram que a presença de determinados alelos no gene *SERPINA1*, que codifica para a α 1-AP, determina uma produção deficiente desta anti-protease, conduzindo a um desequilíbrio proteolítico que aumenta a suscetibilidade para desenvolvimento de determinadas doenças inflamatórias e carcinomas pulmonares. (58,59,69) Adicionalmente, a libertação de mieloperoxidase e o aumento do *stress* oxidativo que acompanham a ativação de neutrófilos, como referido no início deste trabalho, característicos dos doentes renais terminais, podem promover a inativação da α 1-AP, uma vez que esta possui um resíduo de metionina sensível à oxidação, no local de inibição. (70,71,73) Tendo em conta todos estes fatores, a metodologia utilizada neste trabalho na abordagem dos efeitos dos polimorfismos no promotor do gene *ELANE* apenas proporciona uma ideia geral da quantidade de elastase circulante, não mostrando necessariamente uma associação direta com a expressão do gene *ELANE* ou com a quantidade total de elastase produzida.

Por último, a análise da correlação dos polimorfismos com os diferentes parâmetros clínicos e bioquímicos permitiu constatar que não existia relação entre os diferentes genótipos e o processo inflamatório nos doentes renais terminais, comprovado pelas diferenças pouco significativas dos valores de proteína C-reativa e de IL-6 entre grupos ($p \approx 0,5$ em ambos os parâmetros para os dois polimorfismos em análise). Do mesmo modo, não se verificaram variações significativas nos

valores de oxLDL, sugerindo que o estado de *stress* oxidativo não é influenciado pelos diferentes polimorfismos da região promotora do gene *ELANE*. O genótipo AA para o polimorfismo c.-741G>A revelou-se, mais uma vez, uma exceção, tendo valores aumentados de oxLDL, com significância estatística ($p=0,013$). No entanto, esta observação pode, novamente, ser devida ao número reduzido de doentes que possuem este genótipo como, aliás, é sustentado pelo facto de ser o único genótipo a apresentar valores aumentados de bilirrubina e valores diminuídos de albumina ($p<0,001$ e $p=0,028$, respetivamente) sem qualquer relação aparente com outros parâmetros.

VI. Conclusão

VI. Conclusão

Tal como referido, foram publicados já vários estudos com foco na análise dos polimorfismos da região promotora do gene *ELANE*. No entanto, o presente trabalho constitui o primeiro estudo sobre esta temática envolvendo a população portuguesa, em particular, os doentes renais crónicos. Assim, procurou-se identificar os polimorfismos no promotor deste gene, averiguar a sua prevalência e esclarecer o seu potencial efeito nas complicações que acompanham a doença renal crónica.

Tendo por base os objetivos traçados inicialmente, o rastreio efetuado ao promotor do gene *ELANE* permitiu identificar três dos cinco polimorfismos previamente descritos por outros autores, e ainda dois novos polimorfismos, nomeadamente o SNP c.-801G>A e a presença de um bloco extra, composto pela 4ª e pela 5ª repetição constituintes da região promotora do gene *ELANE*. No grupo de polimorfismos identificados, concluiu-se que o c.-903T>G e o c.-741G>A apresentavam as maiores prevalências. Os níveis de elastase circulante, determinados por ELISA, não revelaram variações significativas para os diferentes genótipos destes dois polimorfismos, pelo que estes parecem não influenciar a concentração de elastase nos doentes em hemodiálise. Adicionalmente, estes polimorfismos não apresentaram qualquer relação com o estado inflamatório e de *stress* oxidativo dos doentes, nem com outro parâmetro clínico ou bioquímico em análise, o que sugere que os polimorfismos da região promotora do gene *ELANE* não determinam o prognóstico da doença renal crónica.

Um fator limitante neste trabalho foi o número relativamente reduzido de indivíduos envolvidos, que dificultou a própria análise dos resultados obtidos. Por esta razão, seria de particular interesse realizar o mesmo estudo numa população mais alargada de doentes renais crónicos, com o intuito de:

(i) determinar as prevalências e as frequências alélicas dos polimorfismos identificados, em específico, dos dois novos identificados, nesta população em particular;

Conclusão

(ii) confirmar se a homozigotia para o polimorfismo c.-741G>A pode influenciar significativamente a concentração plasmática de elastase, uma vez que este genótipo apresentou uma tendência para valores diminuídos de elastase;

(iii) averiguar se as diferenças estatisticamente significativas que se observaram para a homozigotia do polimorfismo c.-741G>A, nomeadamente no que diz respeito aos valores de contagem de neutrófilos e às concentrações plasmáticas de oxLDL, albumina e de bilirrubina, são devidos ou não ao baixo número de doentes que apresentavam este genótipo;

(iv) e avaliar o efeito das duplicações identificadas na região promotora do gene *ELANE* na concentração plasmática de elastase.

VII. Bibliografia

VII. Bibliografia

1. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. Clinical Chemistry: techniques, principles, correlations. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 557–77.
2. Gaw A, Cowan RA, O'Reilly DSt.J, Stewart MJ, Shepherd J. Clinical Biochemistry. 2nd ed. Glasgow, UK: Churchill Livingstone; 1999. p. 26–33.
3. National Kidney Foundation – Kidney Disease: Improving Global Outcomes. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl.* 2013;3(1):1–150.
4. Fassett RG, Venuthurupalli SK, Gobe GC, Coombes JS, Cooper MA, Hoy WE. Biomarkers in chronic kidney disease: a review. *Kidney Int.* 2011;80(8):806–21.
5. Spanaus K-S, Kollerits B, Ritz E, Hersberger M, Kronenberg F, von Eckardstein A. Serum creatinine, cystatin C, and beta-trace protein in diagnostic staging and predicting progression of primary nondiabetic chronic kidney disease. *Clin Chem.* 2010;56(5):740–9.
6. Fouda M, Sherif HM, Shehata M, Ibrahim A. Early expression of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin biomarker predicts acute kidney injury complicating circulatory shock. *Egypt J Crit Care Med.* 2013;1(2):79–86.
7. Lenz O, Fornoni A. Chronic kidney disease care delivered by US family medicine and internal medicine trainees: results from an online survey. *BMC Med.* 2006;4(1):30.
8. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE. The impact of anemia on cardiomyopathy, morbidity, and mortality in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1996;28(1):53–61.
9. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Hu L, O'Dea R, Murray DC, Barre PE. Hypocalcemia, morbidity, and mortality in end-stage renal disease. *Am J Nephrol.* 1996;16(5):386–93.
10. Costa E. Resistance to recombinant human erythropoietin therapy in haemodialysis patients. Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto para obtenção do grau de doutor; Universidade do Porto, Porto, Portugal. 2008. p. 23–59.
11. Astrup AS, Tarnow L, Pietraszek L, Schalkwijk CG, Stehouwer CDA, Parving H-H, Rossing P. Markers of endothelial dysfunction and inflammation in type 1 diabetic patients with or without diabetic nephropathy followed for 10 years: association with mortality and decline of glomerular filtration rate. *Diabetes Care.* 2008;31(6):1170–6.

Bibliografia

12. Macário F. Relatório do gabinete de registo da Sociedade Portuguesa de Nefrologia. Sociedade Portuguesa de Nefrologia, Lisboa, Portugal. 2014. p.1-52.
13. Weis L, Metzger M, Haymann J-P, Thervet E, Flamant M, Vrtovsnik F, Gauci C, Houillier P, Froissart M, Letavernier E, Stengel B, Boffa J-J. Renal function can improve at any stage of chronic kidney disease. *PLoS One*; 2013;8(12):e81835.
14. Rosner MH. Hemodialysis for the non-nephrologist. *South Med J*. 2005;98(8):785–91.
15. Rifkin B, Brewster U. Dialysis modalities: what the non-nephrologist needs to know. *Hosp Physician*. 2006;42(8):11–9.
16. Ronco C, Clark W. Factors affecting hemodialysis and peritoneal dialysis efficiency. *Semin Dial*. 2001;14(4):257–62.
17. Tattersall JE, Ward RA. Online haemodiafiltration: definition, dose quantification and safety revisited. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(3):542–50.
18. Afshar R, Nadoushan MJ, Sanavi S, Komeili A. Assessment of hemodialysis adequacy in patients undergoing maintenance maneuver by laboratory tests. *Iran J Pathol*. 2006;1(2):55–60.
19. Costa E, Rocha S, Rocha-Pereira P, Castro E, Reis F, Teixeira F, Miranda V, Do Sameiro Faria M, Loureiro A, Quintanilha A, Belo L, Santos-Silva A. Cross-talk between inflammation, coagulation/fibrinolysis and vascular access in hemodialysis patients. *J Vasc Access*. 2008;9(4):248–53.
20. Do Sameiro-Faria M, Ribeiro S, Costa E, Mendonça D, Teixeira L, Rocha-Pereira P, Fernandes J, Nascimento H, Kohlova M, Reis F, Amado L, Bronze-da-Rocha E, Miranda V, Quintanilha A, Belo L, Santos-Silva A. Risk factors for mortality in hemodialysis patients: two-year follow-up study. *Dis Markers*. 2013;35(6):791–8.
21. Costa E, Rocha S, Rocha-Pereira P, Nascimento H, Castro E, Miranda V, Faria MS, Loureiro A, Quintanilha A, Belo L, Santos-Silva A. Neutrophil activation and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in hemodialysis patients. *Am J Nephrol*. 2008;28(6):935–40.
22. Jager KJ, Lindholm B, Goldsmith D, Fliser D, Wiecek A, Suleymanlar G, Ortiz A, Massy Z, Martinez-Castelao A, Agarwal R, Blankestijn PJ, Covic A, London G, Zoccali C, Dekker FW. Cardiovascular and non-cardiovascular mortality in dialysis patients: where is the link? *Kidney Int Suppl*. 2011;1(1):21–3.
23. Ceciliani F, Giordano A, Spagnolo V. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein Pept Lett*. 2002;9(3):211–23.

24. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2005;6(11):1045–56.
25. Tillett WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med*. 1930;52(4):561–71.
26. Macdougall IC, Cooper AC. Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17 Suppl 1:39–43.
27. Costa E, Belo L, Santos-Silva A. Neutrophil activation and erythrocyte membrane protein composition in stage 5 chronic kidney disease patients. In *Chronic Kidney Disease*, Prof. Monika Gööz (ed.). Intech; 2012. p. 209–24.
28. Takahashi H, Nukiwa T, Yoshimura K, Quick CD, States DJ, Holmes MD, Whang-Peng J, Knutsen T, Crystal RG. Structure of the human neutrophil elastase gene. *J Biol Chem*. 1988;263(29):14739–47.
29. Van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res*. 2001;52(3):225–39.
30. Pereira R, Costa E, Gonçalves M, Miranda V, do Sameiro Faria M, Quintanilha A, Belo L, Lima M, Santos-Silva A. Neutrophil and monocyte activation in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship with resistance to recombinant human erythropoietin and to the hemodialysis procedure. *Hemodial Int*. 2010;14(3):295–301.
31. Schindler R, Senf R, Frei U. Influencing the inflammatory response of haemodialysis patients by cytokine elimination using large-pore membranes. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(1):17–9.
32. Naka T, Haase M, Bellomo R. “Super high-flux” or “high cut-off” hemofiltration and hemodialysis. *Contrib Nephrol*. 2010;166:181–9.
33. Sanchez-Izquierdo JA, Perez JL, Lozano MJ, Alted E, Ortuño de Solo B, Ambros A. Cytokines clearance during venovenous hemofiltration in the trauma patient. *Am J Kidney Dis*. 1997;30(4):483–8.
34. De Vriese AS, Colardyn FA, Philippé JJ, Vanholder RC, De Sutter JH, Lameire NH. Cytokine removal during continuous hemofiltration in septic patients. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(4):846–53.
35. Shiga H, Hirasawa H, Nishida O, Oda S, Nakamura M, Mashiko K, Matsuda K, Kitamura N, Kikuchi Y, Fuke N. Continuous hemodiafiltration with a cytokine-adsorbing hemofilter in patients with septic shock: a preliminary report. *Blood Purif*. 2014;38(3-4):211–8.

36. Udeanu M, Guizzardi G, Di Pasquale G, Marchetti A, Romani F, Dalmastri V, Capelli I, Stalteri L, Cianciolo G, Rucci P, Manna GL. Relationship between coronary artery disease and C-reactive protein levels in NSTEMI patients with renal dysfunction: a retrospective study. *BMC Nephrol.* 2014;15:152.
37. Lajer M, Tarnow L, Jorsal A, Teerlink T, Parving H-H, Rossing P. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) predicts cardiovascular morbidity and mortality in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 2008;31(4):747–52.
38. Ravani P, Tripepi G, Malberti F, Testa S, Mallamaci F, Zoccali C. Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risks modeling approach. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(8):2449–55.
39. Abdalla M, Yassein S, Darwish KH. T-cell function, T-cell phenotype and its role in responsiveness to recombinant human erythropoietin in hemodialysis patients. *Egypt J Immunol.* 2010;17(2):67–80.
40. Thawani N, Tam M, Chang K-H, Stevenson MM. Interferon-gamma mediates suppression of erythropoiesis but not reduced red cell survival following CpG-ODN administration in vivo. *Exp Hematol.* 2006;34(11):1451–61.
41. Cooper AC. Increased Expression of Erythropoiesis Inhibiting Cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-10, and IL-13) by T Cells in Patients Exhibiting a Poor Response to Erythropoietin Therapy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(7):1776–84.
42. Atanasiu V, Manolescu B, Stoian I. Hepcidin-central regulator of iron metabolism. *Eur J Haematol.* 2007;78(1):1–10.
43. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004;306(5704):2090–3.
44. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood.* 2006;108(9):3204–9.
45. Libetta C, Sepe V, Esposito P, Galli F, Dal Canton A. Oxidative stress and inflammation: Implications in uremia and hemodialysis. *Clin Biochem.* 2011;44(14-15):1189–98.
46. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thévenin M, Jaudon MC, Zingraff J, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(6):845–53.

47. Ajala MO, Ogunro PS, Odun A. Effect of hemodialysis on total antioxidant status of chronic renal failure patients in government hospitals in Lagos Nigeria. *Niger J Clin Pract.* 2011;14(2):154–8.
48. Kim HJ, Vaziri ND. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298(3):F662–71.
49. Costa E, Rocha S, Rocha-Pereira P, Castro E, Miranda V, Faria MS, Loureiro A, Quintanilha A, Belo L, Santos-Silva A. Band 3 profile as a marker of erythrocyte changes in chronic kidney disease patients. *The Open Clin Chem J.* 2008;1:1-7.
50. Liu G-H, Qu J, Shen X. NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783(5):713–27.
51. Moradi H, Pahl M V, Elahimehr R, Vaziri ND. Impaired antioxidant activity of high-density lipoprotein in chronic kidney disease. *Transl Res.* 2009;153(2):77–85.
52. Kirmizis D, Papagianni A, Belechri A-M, Memmos D. Effects of vitamin E-coated membrane dialyser on markers of oxidative stress and inflammation in patients on chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(7):2296–301.
53. An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol.* 2008;141(3):367–75.
54. Santos-Silva A, Castro EM, Teixeira NA, Guerra FC, Quintanilha A. Erythrocyte membrane band 3 profile imposed by cellular aging, by activated neutrophils and by neutrophilic elastase. *Clin Chim Acta.* 1998;275(2):185–96.
55. Costa E, Rocha S, Rocha-Pereira P, Castro E, Miranda V, Faria MS, Loureiro A, Quintanilha A, Belo L, Santos-Silva A. Changes in red blood cells membrane protein composition during hemodialysis procedure. *Ren Fail.* 2008;30(10):971–5.
56. Pereira R, Rocha S, Borges A, Nascimento H, Reis F, Miranda V, Faria MS, Quintanilha A, Belo L, Costa E, Santos-Silva A. Elastase release during the hemodialysis procedure seems to induce changes in red blood cell membrane proteins. *Hemodial Int.* 2011;15(3):429–31.
57. Nikolic A, Milosevic K, Boskovic S, Nestorovic B. Neutrophil elastase gene polymorphisms: modulators of response to therapy in childhood bronchiectasis? *Lung.* 2014;192(4):595–9.
58. Taniguchi K, Yang P, Jett J, Bass E, Meyer R, Wang Y, Deschamps C, Liu W. Polymorphisms in the Promoter Region of the Neutrophil Elastase Gene Are Associated with Lung Cancer Development. *Clin Cancer Res.* 2002;8(4):1115–20.

59. Park JY, Chen L, Lee J, Sellers T, Tockman MS. Polymorphisms in the promoter region of neutrophil elastase gene and lung cancer risk. *Lung Cancer*. 2005;48(3):315–21.
60. Papadaki HA, Eliopoulos GD. The role of apoptosis in the pathophysiology of chronic neutropenias associated with bone marrow failure. *Cell Cycle*. 2003;2(5):447–51.
61. Germeshausen M, Deerberg S, Peter Y, Reimer C, Kratz CP, Ballmaier M. The spectrum of ELANE mutations and their implications in severe congenital and cyclic neutropenia. *Hum Mutat*. 2013;34(6):905–14.
62. Horwitz MS, Duan Z, Korkmaz B, Lee H-H, Mealiffe ME, Salipante SJ. Neutrophil elastase in cyclic and severe congenital neutropenia. *Blood*. 2007;109(5):1817–24.
63. Aprikyan AA, Dale DC. Mutations in the neutrophil elastase gene in cyclic and congenital neutropenia. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(5):535–8.
64. Yoshimura K, Crystal RG. Transcriptional and posttranscriptional modulation of human neutrophil elastase gene expression. *Blood*. 1992;79(10):2733–40.
65. Fouret P, du Bois RM, Bernaudin JF, Takahashi H, Ferrans VJ, Crystal RG. Expression of the neutrophil elastase gene during human bone marrow cell differentiation. *J Exp Med*. 1989;169(3):833–45.
66. Janmaat VT, Van de Winkel A, Peppelenbosch MP, Spaander MCW, Uitterlinden AG, Pourfarzad F, Tilanus HW, Rygiel AM, Moons LMG, Arp PP, Krishnadath KK, Kuipers EJ, Van der Laan, LJW. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with reduced esophageal vitamin D receptor expression and reduced esophageal adenocarcinoma risk. *Mol Med*. 2015; (ahead of printing version).
67. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res*. 1998;58(23):5321–5.
68. Knight JC, Udalova I, Hill A V, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K, Kwiatkowski D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet*. 1999;22(2):145–50.
69. Yang P, Wentzlaff KA, Katzmann JA, Marks RS, Allen MS, Lesnick TG, Lindor NM, Myers JL, Wiegert E, Midthun DE, Thibodeau SN, Krowka MJ. Alpha1-antitrypsin deficiency allele carriers among lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999;8(5):461–5.
70. Polańska B, Augustyniak D, Makulska I, Niemczuk M, Jankowski A, Zwolińska D. Elastase, α 1-proteinase inhibitor, and interleukin-8 in children and young adults with

- end-stage kidney disease undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Arch Immunol Ther Exp*. 2014;62(3):239–45.
71. Korkmaz B, Attucci S, Jourdan M-L, Juliano L, Gauthier F. Inhibition of neutrophil elastase by alpha1-protease inhibitor at the surface of human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol*. 2005;175(5):3329–38.
 72. Owen CA, Campbell MA, Sannes PL, Boukedes SS, Campbell EJ. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J Cell Biol*. 1995;131(3):775–89.
 73. Honda H, Ueda M, Kojima S, Mashiba S, Hirai Y, Hosaka N, Suzuki H, Mukai M, Watanabe M, Takahashi K, Shishido K, Akizawa T. Assessment of myeloperoxidase and oxidative alpha1-antitrypsin in patients on hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(1):142–51.

Anexos

Anexos

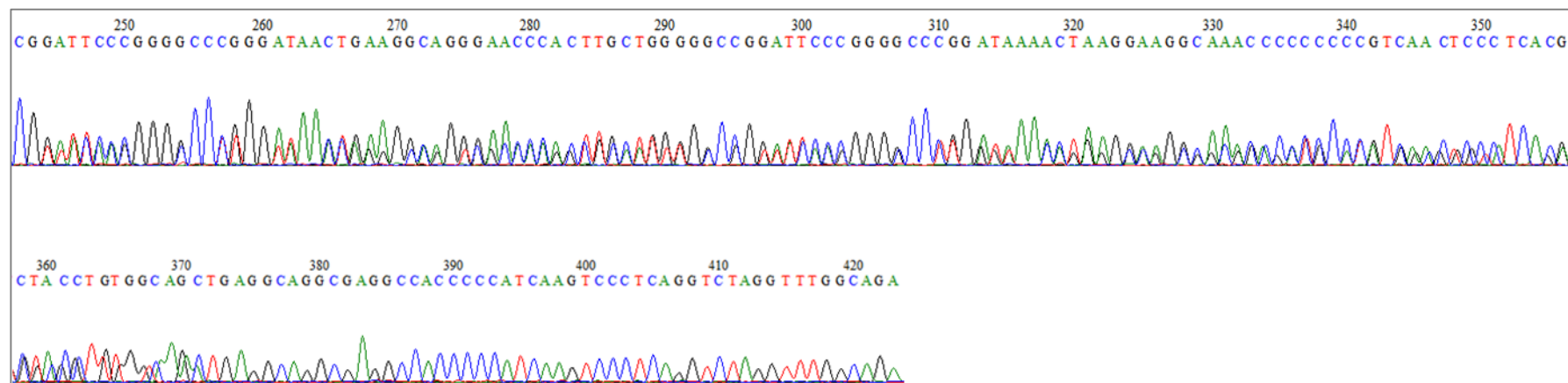


Figura 17 - Eletroferograma parcial correspondente à amostra N58, revelando heterozigotia para a sequência extra de 52 pb na região promotora do gene ELANE.

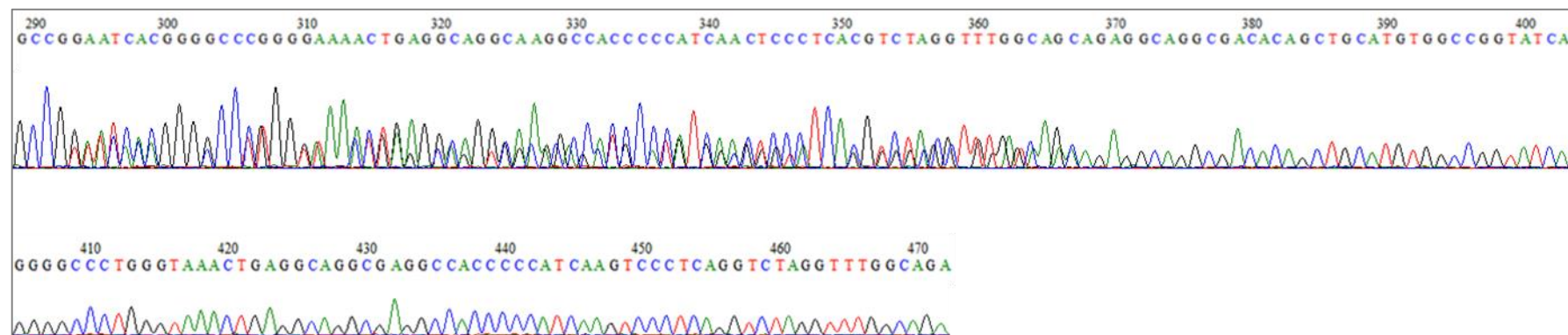


Figura 18 - Eletroferograma parcial correspondente à amostra N68, revelando heterozigotia para o bloco extra de repetições na região promotora do gene ELANE.

Tabela 7 - Polimorfismos identificados em cada doente e respetivos genótipos.

Doente	Polimorfismo	Genótipo	Doente	Polimorfismo	Genótipo
H5	c.-741G>A	GA	N53	Wild type	--
H6	Wild type	--	N54	Wild type	--
H7	c.-741G>A	AA	N55	c.-903T>G	TG
H8	Wild type	--	N56	Wild type	--
H9	Wild type	--	N57	Wild type	--
N10	Wild type	--	N58	Extra 52 pb	Hetero
N11	Wild type	--	N59	c.-741G>A	GA
N12	Wild type	--	N60	Wild type	--
N13	Wild type	--	N61	c.-741G>A	GA
N14	Wild type	--	N62	c.-801G>A	GA
N15	c.-903T>G/ c.-741G>A	TG/GA	N63	Wild type	--
N16	c.-741G>A	GA	N64	Wild type	--
N17	Wild type	--	N65	c.-903T>G	TG
N18	Wild type	--	N66	Wild type	--
N19	c.-741G>A	GA	N67	Wild type	--
N20	c.-741G>A	GA	N68	Extra bloco	Hetero
N21	Wild type	--	N69	c.-903T>G	TG
N22	c.-741G>A	GA	N70	c.-741G>A	GA
N23	Wild type	--	N71	c.-903T>G	TG
N24	Wild type	--	N72	c.-741G>A	GA
N25	Wild type	--	N73	c.-741G>A	GA
N26	Wild type	--	N74	Wild type	--
N27	Wild type	--	N75	Wild type	--
N28	Wild type	--	N76	Wild type	--
N29	Wild type	--	N77	Wild type	--
N30	Wild type	--	N78	c.-741G>A	GA
N32	c.-741G>A	GA	N79	c.-741G>A	GA
N34	Wild type	--	N80	c.-741G>A	GA
N35	Wild type	--	N81	Wild type	--
N36	Wild type	--	N82	c.-741G>A	GA
N37	Wild type	--	N84	Wild type	--
N38	Wild type	--	N86	Wild type	--
N39	c.-741G>A	GA	N92	c.-741G>A	GA
N40	Wild type	--	N93	Wild type	--
N41	c.-741G>A	GA	N95	c.-741G>A	GA
N42	Wild type	--	N96	c.-903T>G	TG
N44	Wild type	--	N98	c.-741G>A	GA
N45	Wild type	--	N103	Wild type	--
N46	c.-903T>G	TG	N104	Wild type	--
N47	Wild type	--	N105	Wild type	--
N48	Wild type	--	N108	c.-741G>A	GA
N49	c.-903T>G	TG	N111	c.-741G>A	GA
N50	c.-741G>A	GA	N112	c.-741G>A	GA
N52	Wild type	--	N113	Wild type	--

Tabela 7 - Polimorfismos identificados em cada doente e respetivos genótipos (continuação).

Doente	Polimorfismo	Genótipo	Doente	Polimorfismo	Genótipo
N114	<i>Wild type</i>	--	N142	c.-903T>G	TG
N117	c.-741G>A	GA	N144	Extra bloco	Hetero
N118	c.-741G>A	AA	N145	Extra 52 pb	Hetero
N119	<i>Wild type</i>	--	N148	c.-741G>A	GA
N120	<i>Wild type</i>	--	N149	<i>Wild type</i>	--
N123	c.-741G>A	GA	N150	<i>Wild type</i>	--
N124	c.-741G>A	GA	N151	Extra 52 pb	Hetero
N125	c.-741G>A	GA	N152	c.-741G>A	GA
N127	<i>Wild type</i>	--	N153	<i>Wild type</i>	--
N128	<i>Wild type</i>	--	N154	<i>Wild type</i>	--
N130	c.-741G>A	GA	N156	c.-741G>A	GA
N131	<i>Wild type</i>	--	N157	<i>Wild type</i>	--
N132	<i>Wild type</i>	--	N158	c.-741G>A	GA
N134	c.-903T>G	TG	N159	Extra 52 pb	Hetero
N135	c.-903T>G/ c.-741G>A	TG/GA	N160	c.-741G>A	AA
N139	<i>Wild type</i>	--	N161	c.-741G>A	GA
N140	<i>Wild type</i>	--	N162	<i>Wild type</i>	--
N141	c.-903T>G	TG			